Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Primäre Mikrozephalie

Einblicke in Expression und Funktion von MCPH1/Microcephalin und seiner Isoformen

vorgelegt von

Ioannis Gavvovidis

geboren in Tsalka

Würzburg

2010

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Mitglieder der Promotionskommission:
Vorsitzender: Prof. Dr. Th. Dandekar
1. Gutachter: Prof. Dr. D. Schindler
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Buchner

Tag der Promotionskolloquiums:

Meinen Eltern gewidmet

Αφιερώνεται στους γωνείς μου

Erklärung

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999.

1. Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.
2. Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
3. Ich erkläre des Weiteren, dass ich außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegenen Graden keine anderen akademischen Grade erworben habe oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Ioannis Gavvovidis

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung

Primäre Mikrozephalie (MCPH) ist eine heterogene, autosomal rezessive Störung des Menschen, die durch eine enorme Reduzierung des Hirnvolumens und variable geistige Behinderung ohne zusätzliche neurologische Defizite charakterisiert ist. Fünf einzeln ursächliche Gene sind bislang identifiziert. Zelluläres Merkmal von Patienten mit biallelischen Mutationen im *MCPH1*-Gen ist die vorzeitige Chromosomenkondensation in der G2-Phase des Zellzyklus sowie die verzögerte Chromosomendekondensation in der darauf folgenden G1-Phase (PCC-Syndrom). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass *MCPH1* für zwei Haupttranskripte kodiert: *Full-length-MCPH1* und ein Transkript ohne die Sequenz der letzten fünf Exons (*MCPH1Δe9-14*). Das vom *Full-length*-Transkript kodierte Polypeptid enthält eine N-terminale und zwei C-terminale BRCT-Domänen, während der MCPH1Δe9-14-Isoform die beiden C-terminalen BRCT-Domänen fehlen. Beide Varianten zeigen eine ähnliche Höhe der Gewebe-spezifischen Expression und sind in bestimmten fötalen Organen stärker vertreten als in adulten. Beide Isoformen werden während des Zellzyklus antagonistisch reguliert. Beide sind Zellkern-spezifische Proteine. Drei Kernlokalisierungssequenzen wurden *in silico* identifiziert. Die funktionelle Untersuchung dieser Signale ergab, dass zwei von ihnen unabhängig voneinander den Kerntransport des Proteins bewerkstelligen können. Die alleinige Expression der jeweiligen Variante ist ausreichend, um die defekte Chromosomenkondensation in MCPH1-defizienten Zellen zu komplementieren. Fehlende Komplementation mit der Deletionsvariante MCPH1Δe1-7 weist die N-terminale Region von MCPH1 als unentbehrlich zur Verhinderung von PCC aus. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine redundante Funktion der beiden Isoformen in der Regulierung der Chromosomenkondensation hin. Im Gegensatz dazu verhalten sie sich unterschiedlich im Bezug auf die DNA-Schadensantwort. Während *Full-length*-MCPH1 in strahlungsinduzierten Reparaturfoci lokalisiert werden kann, wird für MCPH1Δe9-14 keine Kolokalisierung mit phosphoryliertem H2AX nach DNA-Schadensinduktion beobachtet. Zusammenfassend kann man feststellen, dass das *MCPH1*-Gen für unterschiedliche Isoformen mit differenzieller Regulation auf RNA-Ebene und verschiedenen Funktionen auf Protein-Ebene kodiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erleichtern das Verständnis der diversen Funktionen von MCPH1 in der Zelle.

Abstract

Primary microcephaly (MCPH) is a heterogeneous autosomal recessive human disorder characterized by pronounced reduction of brain size and variable mental retardation without additional neurological deficits. To date, biallelic mutations in any of five genes have been identified to cause MCPH. A hallmark of patients with mutations in the *MCPH1* gene is a cellular phenotype with premature chromosome condensation in the G2 phase of the cell cycle and delayed decondensation in the subsequent G1 phase (PCC syndrome). Here, we find that *MCPH1* encodes two major species of transcripts: full-length *MCPH1* and a transcript lacking sequence of the five 3'-exons of the gene (*MCPH1Δe9-14*). The polypeptide encoded by the full length transcript contains one N-terminal and two C-terminal BRCT domains, while the protein encoded by the *MCPH1Δe9-14* variant is lacking the tandem C-terminal BRCT domains. Both variants show similar tissue-specific expression patterns, are likewise abundant in many foetal over adult organs, but are regulated antagonistically during cell cycle progression. Both MCPH1 isoforms show nuclear localization. Three nuclear localization signal sequences were identified *in silico* two of which proved to contribute individually to nuclear targeting. Expression of full-length MCPH1 or MCPH1Δe9-14 is independently able to complement the defective chromosome condensation in MCPH1-deficient cells. In contrast, attempts to complement with the mutant variant MCPH1Δe1-7 failed and thus identify the N-terminus of MCPH1 as crucial for the prevention of PCC. The present results suggest a redundant function of full-length and Δe9-14 MCPH1 in the regulation of chromosome condensation but different behaviour in the DNA damage response: While full-length MCPH1 localizes to nuclear repair foci following ionizing irradiation, MCPH1Δe9-14 fails to co-localize with phosphorylated H2AX. The results of the present study show that the *MCPH1* gene encodes different isoforms that are differentially regulated at the transcript level and have differential functions at the protein level. These findings facilitate a better understanding of the diverse cellular functions claimed to MCPH1.

1 Einleitung

1.1 Zellzykluskontrolle

1.1.1 Zellzyklus

Die Verdopplung von Zellen verläuft in Phasen, die cytologisch sowie biochemisch in Interphase und Mitose untergliedert werden. Die Interphase wird in G1-, S- und G2-Phase unterteilt und beansprucht die längste Zeit im Zellzyklus. Nach der Kernteilung treten Eukaryontenzellen in die G1-Phase ein. Die G1-Phase ist durch einen diploiden Chromosomensatz gekennzeichnet. In dieser Phase finden eine Vermehrung der Zellmasse und diejenigen biochemischen Prozesse statt, die der Vorbereitung der Zelle auf die folgende S-Phase dienen. Unter anderem werden Proteine synthetisiert, die für die DNA-Replikation notwendig sind. Durch bestimmte Rückkopplungsmechanismen in den G1- und G2-Phasen, auf die später näher eingegangen wird, wird der Zellzyklusablauf kontrolliert. An solchen Kontrollpunkten oder Checkpoints kann die Zelle den Übertritt in die jeweils folgende Phase freigeben oder verhindern. Teilungsunfähige ausdifferenzierte oder ruhende Zellen treten nicht in die S-Phase ein und werden als G0-Phase-Zellen bezeichnet. Sie haben wie G1-Phase-Zellen einen nicht-replizierten, diploiden DNA-Gehalt und sind über dieses Merkmal nicht von G1-Phase-Zellen zu unterscheiden. Im Gegensatz zu G0-Phase-Zellen sind G1-Phase-Zellen jedoch empfänglich gegenüber extrazellulären Signalen, wie dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, und können in die folgende S-Phase übertreten, in der die Verdopplung der DNA stattfindet und Proteine synthetisiert werden, welche die DNA in Chromosomenstrukturen organisieren. In der G2-Phase wird die Zelle für den Übergang in die Mitose vorbereitet. Durch den sogenannten G2/M-Checkpoint wird sichergestellt, dass die DNA zuvor vollständig repliziert wurde und eventuelle Replikationsfehler oder DNA-Schäden behoben wurden.

Die meisten Steuerungsmechanismen innerhalb des Zellzyklus regeln das Eintreten von Zellen in die S-Phase und die Mitose. Dabei sind es zyklisch regulierte Proteinkinasen, die als Heterodimere, bestehend aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit, wirksam sind (Abb. 1.1). Konzentrationen der regulatorischen Untereinheiten wer-

den durch Transkription und Proteolyse zyklisch reguliert. Daher werden sie als Cycline bezeichnet [1]. Durch Bindung an die Cycline werden die katalytischen Untereinheiten aktiviert, weshalb man diese Cyclin-abhängige Kinasen nennt (CDK, *cyclin dependent kinase*). Die Cyclin-CDK-Komplexe aktivieren oder inhibieren durch Phosphorylierung andere Proteine, die während der DNA-Synthese und bei den Vorgängen der Mitose eine Rolle spielen.

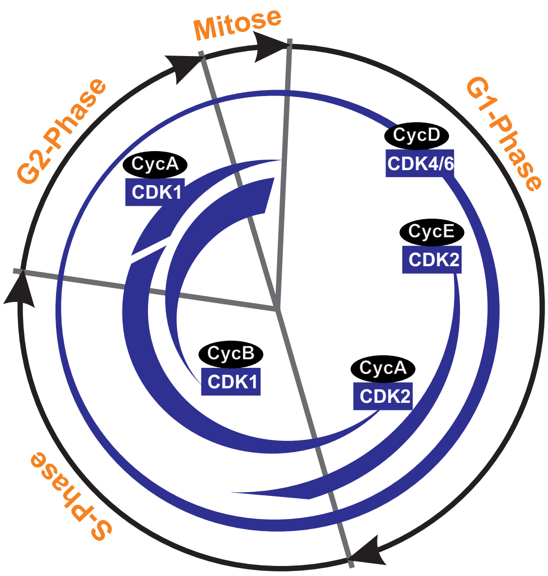


Abbildung 1.1 *Die Konzentrationen von Cyclin-CDK-Komplexe variieren während des Zellzyklus Phasen-spezifisch. Die Kreisabschnitte spiegeln die Zeit wieder, die jede Phase in Anspruch nimmt. Modifiziert nach [2].*

Die Aktivität der Cyclin-CDK-Dimere wird durch weitere Proteinkinasen und -phosphatasen reguliert. Ein gut untersuchtes Beispiel stellt die E2F-Familie (*E2 factor*) der Transkriptionsfaktoren dar. Sie bilden Heterodimere mit DP1 (*differentiation regulated transcription factor protein*), deren Aktivität durch die Bindung des unphosporylierten Retinoblastoma-Tumorsuppressors Rb blockiert wird. Eine Hyperphosphorylierung von Rb während der G1-Phase durch Cyclin-D/E-CDKs führt zu Dissoziation des E2F-DP1-Dimers von Rb [3]. E2F-DP1 kann dann die Expression von Genen transaktivieren, deren Produkte für den Eintritt der Zelle in die S-Phase erforderlich sind. Wird die DP1-Untereinheit des E2F-DP1-Komplexes durch Cyclin-A-CDK2 in der späten S-Phase phosphoryliert, so wird die transkriptionsfördernde Fähigkeit des Dimers herabgesetzt [4]. Für die Einleitung der Mitose spielt Cyclin B eine entscheidende Rolle, welches erstmals in der S-Phase gebildet wird und zu Beginn der Mitose die höchste Konzentration aufweist. Zusammen mit CDK1 bildet Cyclin B den Schlüsselbestandteil des Mitose-unterstützenden Faktors MPF (*M-phase promoting factor*). Cyclin-B-CDK1 wechselt während der G2-Phase zwischen Cyto- und Nukleoplasma bis es phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung führt zur aktiven Anhäufung von Cyclin-B-CDK1 im Zellkern. Die Phosphatase CDC25 aktiviert Cyclin-B-CDK1, wodurch Wechselwirkungen induziert werden, die in der Zelle die Mitose irreversibel einleiten [5].

In der Mitose erfolgt die Verteilung der in der S-Phase verdoppelten chromosomalen DNA auf die entstehenden Tochterzellen. Die Mitose wird in Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und Telophase unterteilt (Abb. 1.2). In der frühen Prophase beginnt die Konden-

sation des Chromatins, was schließlich zur Ausbildung der Mitose-Chromosomen führt, die jeweils aus zwei Chromatiden bestehen, die im Centromerbereich und an anderen Positionen verbunden bleiben. Die Mitose ist die einzige Phase im Zellzyklus, in welcher einzelne Chromosomen lichtmikroskopisch sichtbar sind. Der genaue Mechanismus der Chromosomenkondensation ist nicht vollständig aufgeklärt. Es scheinen jedoch DNA-Topoisomerase II sowie die Condensine I und II wichtige Faktoren dabei zu sein. So ändert sich die Konzentration der Topoisomerase II in Chromosomen während des Zellzyklus. Maximale Werten werden dabei in der Prometaphase, minimale nach der Telophase gefunden. Die chromosomale Lokalisierung der Topoisomerase II korreliert mit jener spezifischen Phosphorylierung am Serin 1212 [6]. Zurzeit gibt es nur hypothetische Modelle, wie die Condensine *in vivo* mit der DNA interagieren, damit schließlich die stabförmige Struktur der Mitose-Chromosomen entsteht. *In vitro* konnte allerdings gezeigt werden, dass Condensin I in Anwesenheit von ATP und Topoisomerase II in der Lage ist, positive Supercoils in die DNA einzuführen und diese in einer sogenannten solinoiden Struktur anzuordnen [7]. Für die Regulation der Condensin-Aktivität während des Zellzyklus scheint ihre Phosphorylierung durch die Kinase CDC2 eine Rolle zu spielen [8].

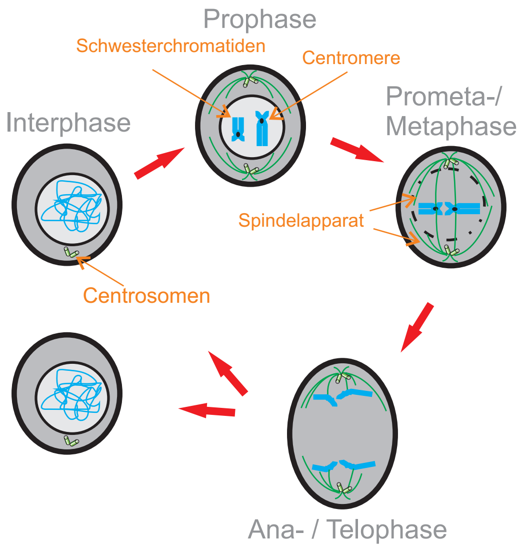


Abbildung 1.2 *Vereinfachtes Modell der mitotischen Teilung bei Säugetierzellen. Modifiziert nach [2]*

Ein weiterer wichtiger Prozess, der den einwandfreien Ablauf der Zellteilung gewährleistet, ist die korrekte Ausbildung und Positionierung des Spindelapparates [9]. Während der Interphase wird das Centrosom verdoppelt. In der Mitose wandern die beiden Centrosome zu entgegengesetzten Polen der Zelle. Aus den Centrosomen entspringen Mikrotubuli und bilden Astralfasern in einer sternförmigen Struktur, die als Aster bezeichnet wird. In der späten Prophase beginnt ausgehend von den beiden Centrosomen die Ausbildung der Mitosespindel, die aus Mikrotubulifasern besteht. Während der Prometaphase löst sich die Zellkernmembran auf und die Spindelfasern dringen ins Karyoplasma ein, wo sie mit den inzwischen zunehmend kondensierten Chromosomen Kontakt aufnehmen. Jede Chromatide besitzt im Centromer eine als Kinetochor bezeichnete Struktur, an welcher die Kinetochorfasern der Mitosespindel haften. Durch deren Zugwirkung nach beiden Seiten kommen die Chromosomen während der Metaphase in einer Ebene in der Mitte zwischen

den beiden Spindelpolen zu liegen (Metaphaseplatte). In der darauf folgenden Anaphase werden die Schwesterchromatiden eines jeden Chromosoms getrennt und durch die Kinetochorfasernzu den entgegen gesetzten Zellpolen gezogen. Am Ende der Anaphase besitzen die beiden Hälften der elterlichen Zelle den gleichen vollständigen Chromosomensatz. In der Telophase formieren sich aus Kernmembranvesikeln neue Zellkernhüllen um die beiden Chromosomensätze. Die Chromosomen beginnen sich allmählich zu entspiralisieren, bis sie wieder den minimalen Kondensationsgrad der Interphasechromosomen erreichen. Gleichzeitig läuft die Cytokinese ab, bei der sich das Cytoplasma teilt. Es entstehen zwei Tochterzellen mit der gleichen genetischen Information.

1.1.2 Checkpoints

Für die genaue Festlegung von Zeit und Reihenfolge der Vorgänge während des Zellzyklus müssen Steuerungsmechanismen (Checkpoints) sicherstellen, dass ein vorangegangenes Ereignis vor dem Beginn eines folgenden Ereignisses abgeschlossen ist. Diese Mechanismen werden auch oder besonders wirksam in Fällen von Schädigung der DNA (z.B. aufgrund von Bestrahlung) oder Störungen des DNA-Stoffwechsels (z.B. beim Fehlen von Nukleotiden). Daher sind die DNA-Schadens-Checkpoints keine besondere Stoffwechselkaskaden, die ausschließlich nach DNA-Schädigung aktiviert werden, sondern es sind vielmehr biochemische Stoffwechselwege, die sich auch unter normalen Zellwachstumsbedingungen abspielen und für den "planmäßigen" Ablauf des Zellzyklus Sorge tragen. Dabei werden Signale erzeugt, die Zellen abhängig von der Phase, in welcher Schäden, Fehler oder Unregelmäßigkeiten im Ablauf des Zellzyklus auftreten, entweder in der G1- (G1/S-Checkpoint) oder G2-Phase (G2/M-Checkpoint) festhalten oder die DNA-Syntheserate in der S-Phase (Intra-S-Checkpoint) herabsetzen [10]. Gleichzeitig wird die Transkription bestimmter Reparaturgene induziert, die nicht konstitutiv exprimiert werden.

Die Komponenten der Checkpoint-Signalwege werden grob in Sensoren, Signal-Übermittler (Mediatoren) und in Effektoren unterteilt (Abb. 1.3), wobei einzelne Proteine Funktionen auf mehreren Ebenen der Signalkaskade übernehmen können. Bei der Replikationsabhängigen DNA-Reparatur spielen die beiden Sensor-Proteinkinasen der PIKK-Familie (*PI-3-kinase-like kinase*), ATM und ATR, eine zentrale Rolle für die Initiation der zwei Checkpoint-Hauptwege. ATM wird durch DNA-Doppelstrangbrüche, ATR hingegen hauptsächlich durch replikationsspezifische DNA-Schäden aktiviert [11]. Für das Downstream-Signaling von ATM ist ein MNR-Komplex von entscheidender Bedeutung, der aus Produkten der Gene *MRE11*, *NBS1* sowie *RAD50* besteht. Die Funktion von ATR wird durch ATRIP und von weiteren Sensor-Proteinen unterstützt, die Bestandteile der RAD17- und 9-1-1-Komplexe sind. Durch direkte Phosphorylierung oder über die Mediatoren wie

MDC1, 53BP1, BRCA1 oder TopBP1 werden die Kinasen CHK1 und CHK2 aktiviert, die das Signal zu Effektoren weiterleiten. Bei diesen Effektoren der Zellzykluskontrolle handelt es sich um die Komponenten der Zellzyklus-Maschinerie und DNA-Replikationsfaktoren wie die CDC25-Phosphatase [10, 11]. Liegt jedoch eine zu große Schädigung vor, die nicht behoben werden kann, wird durch p53 eine Signalkaskade ausgelöst, die über Aktivierung von Caspasen (*cysteinyl aspartatic acid-specific protease*) zu programmiertem Zelltod (Apoptose) führt [12].

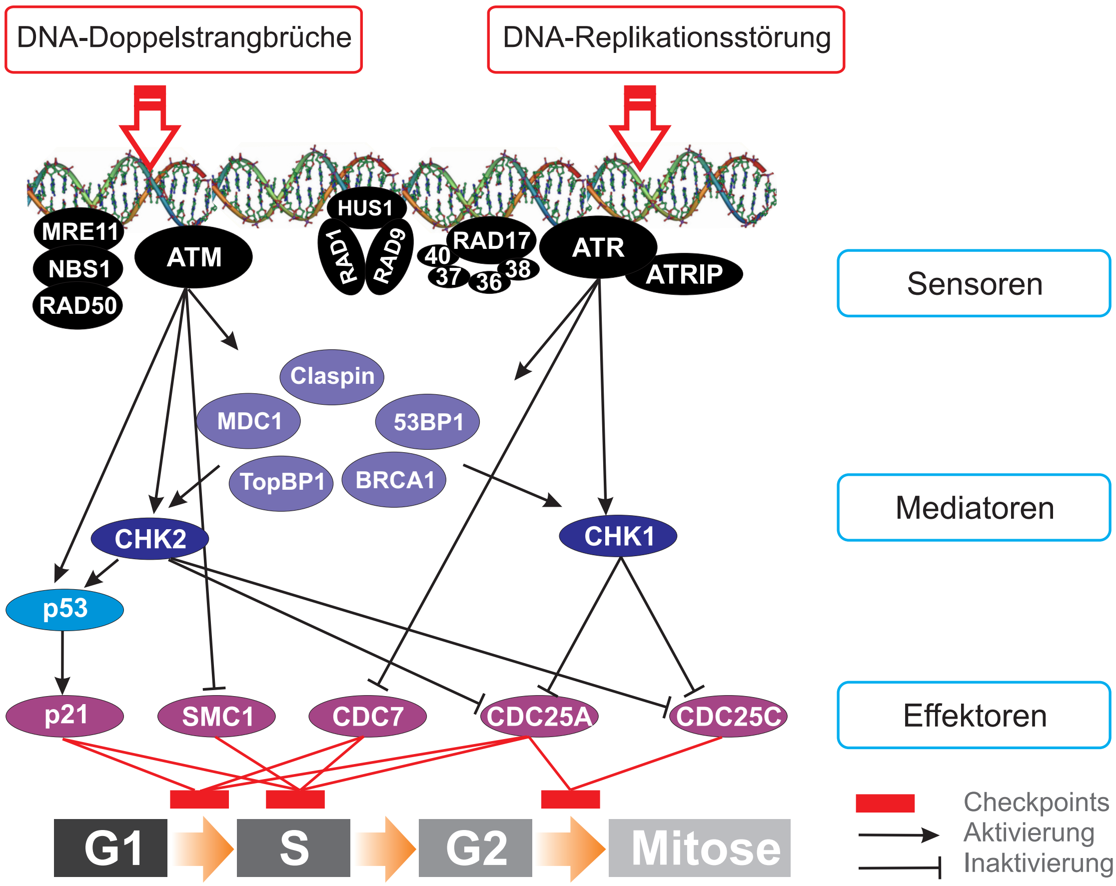


Abbildung 1.3 *Vereinfachtes Modell der DNA-Schadens- und Replikations-Checkpoints in humanen Zellen. DNA-Schädigung bzw. DNA-Replikationsstörung werden von Sensor-Proteinen detektiert, die eine Signalkaskade initiieren, wodurch eine Reihe von Mediatoren und Effektoren aktiviert bzw. inaktiviert werden. Abbildung in Anlehnung an [11].*

Beeinträchtigungen der Checkpoint-Funktionen haben tiefgreifende Auswirkungen auf die genomische Stabilität. Genomische Instabilität wird als ursächlich für Tumorentstehung angesehen [13]. So sind die biologischen Funktionen einer Vielzahl wichtiger Tumorsuppressorgene wie *ATM*, *p53* oder *BRCA1* mit DNA-Schadens-Checkpointssignalwegen verbunden. Darüber hinaus können Beeinträchtigungen der Zellzykluskontrolle negative Einflüsse in der Embryogenese ausüben. Bei Vorgängen wie der cerebralen Corticogenese ist ein einwandfreier Zellteilungsablauf für das schnelle Wachstum der Hirnrinde essentiell.

Vor allem beim Menschen, der im Vergleich mit anderen Organismen einen überproportional expandierten cerebralen Cortex aufweist, führen Verzögerungen im Zellzyklusablauf oder vermehrte Apoptose, die aus ineffizienter DNA-Schadens-Erkennung bzw. -Reparatur resultieren können, zu einer fehlerhaften Corticogenese, die ursächlich für Fehlbildungen des Nervensystems wie Mikrozephalie ist. Diese Störung wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.2 Primäre Mikrozephalie

1.2.1 Klassifizierung der Mikrozephalien

Der Begriff Mikrozephalie wird dem klinischen Bild des verkleinerten occipito-frontalen Kopfumfangs zugeschrieben, welcher mindestens drei Standardabweichungen (SD, *standard deviation*) unter dem alters- sowie geschlechtsbezogenem Mittelwert liegt und mit einer Verringerung des Hirnvolumens einhergeht. Da das menschliche Gehirn zu 55 % aus dem cerebralen Cortex (Großhirnrinde) besteht, ist es dessen verminderte Ausbildung, die einer Mikrozephalie zugrunde liegt und sich in mentaler Retardierung niederschlägt. Eine Mikrozephalie kann genetisch bedingt sein oder durch Umwelteinflüsse entstehen. Zu den letzteren gehört unter anderem Alkoholkonsum der werdenden Mutter, intrauterinäre Infektionen (wie Lues, Cytomegalie-Virus, Toxoplasmose usw.) sowie bestimmte Stoffwechselerkrankungen der Mutter wie Phenylketonuria [14]. Je nach Zeitpunkt des Auftretens einer Mikrozephalie wird diese in primäre (pränatal) bzw. sekundäre (postnatal) unterteilt [15]. Die primäre Mikrozephalie kann mit weiteren Missbildungen assoziiert sein, die entweder nur das Nervensystem oder auch weitere Organe betreffen. Ein weiteres Klassifizierungsmerkmal der Mikrozephalie ist die Hirnarchitektur. So ist Mikrozephalie ein eher variables als definierendes Merkmal von Hirnmissbildungen wie Lissenzephalie, Holoprosenzephalie oder Schisenzephalie [16]. Eine Sonderform der isolierten Mikrozephalie stellt die Mikrozephalie mit einer abnormalen bzw. vereinfachten corticalen Gyrierung dar [17]. Bei der "echten" Mikrozephalie, historisch als *microcephalia vera* bezeichnet, handelt es sich dagegen um eine kongenitale, isolierte Mikrozephalie mit weitgehend normaler Hirnarchitektur (Abb. 1.4). Der Begriff wurde 1885 von C. Giacomini[1] geprägt, um den Umstand zu betonen, dass bei den Betroffenen abgesehen vom kleinen Kopf keine weiteren pathologischen Veränderungen beobachtet wurden [16]. Ein autosomal-rezessiver Erbgang sowie eine Inzidenz von 1:30 000 bis 1:250 000 sind für die "echte" Mikrozephalie charakteristisch [18], wobei die Inzidenz in Populationen mit häufig konsanguinen Ehen entsprechend höher ist (1:10 000 im Nordpakistan, [19]).

[1]Carlo Giacomini (1840-1898): italienischer Arzt, Anthropologe und Anatom.

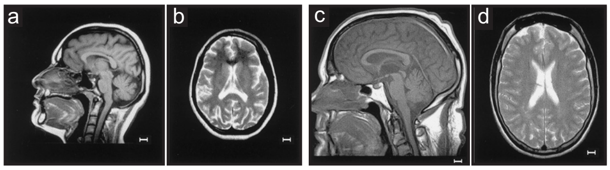


Abbildung 1.4 *Magnetresonanztomografie-Aufnahmen des Gehirns eines MCPH1-Patienten (a: Sagittalschnitt; b: Axialschnitt) und eines gesunden gleichaltrigen Individuums (c,d). Die Maßstabbalken entsprechen 1 cm. Modifiziert nach [21].*

In einigen Teilen der Welt, wie in Nordpakistan, ist Mikrozephalie mit Aberglaube assoziiert. Mikrozephale Kinder werden häufig in Tempeln abgegeben, wo sie aufwachsen und bei religiösen Zeremonien beschäftigt werden [20]. Das auffällige Erscheinungsbild hat auch dazu geführt, dass in der Vergangenheit mikrozephale Individuen als eine Kuriosität auf Jahrmärkten und im Zirkus vorgeführt wurden, so wie der unter dem Namen SCHLITZIE bekannte US-amerikanische Darsteller in Abb. 1.5.

1.2.2 Autosomal rezessive primäre Mikrozephalie

Die autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH, OMIM #606858) wird durch folgende klinische Symptome definiert [19]:

- kongenitale, nicht progressive Mikrozephalie von -3 SD
- variable mentale Retardierung
- keine weiteren neurologischen Befunde wie spastische Lähmung oder Epilepsie
- Körpergröße und Aussehen weitgehend normal

Individuelle Abweichungen von dieser Definition sind möglich; hierauf wird an anderer Stelle nochmals eingegangen.

Tabelle 1.1 *Übersicht über die bekannten MCPH-Genloci*

Chromosom	Locus	Gen	Protein
8p23	MCPH1	*MCPH1*	Microcephalin
19q13.1-q13.2	MCPH2		
9q33.3	MCPH3	*CDK5RAP2*	Cyclin-dependent kinase 5 regulatory associated protein 2
15q15-q21	MCPH4		
1q31	MCPH5	*ASPM*	Abnormal spindle-like microcephaly associated
13q12.2	MCPH6	*CENPJ*	Centromeric protein J
1p32	MCPH7	*STIL*	SCL/TAL1 interrupting locus

MCPH ist genetisch heterogen. Mittels Kopplungsanalysen mit Mikrosatellitenmarkern in großen konsanguinen Familien wurden bisher sieben MCPH-Genloci isoliert: MCPH1 – MCPH7 [18, 22, 23, 24, 25, 26, 27]. Davon wurden inzwischen fünf der kausativen Gene identifiziert: *MCPH1* [28]; *MCPH3* (CDK5RAP2) [29]; *MCPH5* (ASPM) [30]; *MCPH6*

(CENPJ) [29] und *MCPH7* (STIL) [27]. Homozygoten Mutationen im *ASPM*-Gen, die alle zu einem trunkierten Protein führen, sind die häufigste Ursache für MCPH [31]. In der Tabelle 1.1 sind die Charakteristika der MCPH-Gene zusammengefasst.



Abbildung 1.5 *"Schlitzie" oder Shlitze Surtees (1901-1971) war ein US-amerikanischer, geistig behinderter Darsteller, der wegen seiner Mikrozephalie als Zirkuskuriosität vorgeführt wurde. Die Abbildung zeigt Schlitzie an der Seite von Wally Ford in einer Szene aus dem Film "Freaks" von Tod Browning aus dem Jahr 1932. Quelle: http://www.quasi-modo.net/Schlitze.html*

1.2.3 MCPH1

Die Chronik der MCPH1-Entdeckung

MCPH1 wurde als erstes der MCPH-Gene im Jahr 2002 von JACKSON et al. [28] beschrieben. Die Autoren jener Studie hatten eine homozygote C>G-Mutation in Exon 2 des damals noch nicht charakterisierten Gens *AX087870* identifiziert, die sich kausativ für die Mikrozephalie bei 9 Individuen aus zwei konsanguinen Familien pakistanischer Herkunft herausstellte. Diese Mutation resultierte in der Trunkierung des kodierenden Proteins, das die Bezeichnung "Microcephalin" erhielt. Microcephalin besteht aus 835 Aminosäuren und enthält eine N-terminale sowie zwei C-terminale BRCT-Domänen. Im gleichen Jahr berichtete eine Forschergruppe um H. NEITZEL [32] von einer beim Menschen einmaligen Zellzyklusstörung, die sich in der vorzeitigen Chromosomenkondensation äußerte (PCC-Syndrom, *premature chromosome condensation*, OMIM #607117). In Chromosomenpräparaten aus Lymphozyten und Fibroblasten eines Geschwisterpaares mit konsanguinen Eltern fiel ein erhöhter Anteil von Prophase-ähnlichen Zellen[2] (PLCs, *prophase-like cells*) auf (Abb. 1.6), der bei 10 – 15 % lag, während bei Kontrollindividuen weniger als 1 % PLCs detektierbar waren. Das klinische Bild der beiden Patienten umfasste kongenitale Mikrozephalie mit geistiger Retardierung sowie postnatale Wachstumsverzögerung [32]. Ein Jahr später publizierten LIN & ELLEDGE [33] eine Studie, in der nach den negativen Regulatoren der Telomerase-Untereinheit hTERT gesucht wurde. In jener Arbeit wurde unter anderem ein Protein mit BRCT-Domänen vorgestellt, das als BRIT1 – ein Akronym für *BRCT-repeat inhibitor of hTERT expression* – bezeichnet wurde. Seine Sequenz wurde von einem theoretischen Protein abgeleitet, das später als Produkt des *MCPH1*-Gens identifiziert wurde. Schließlich wurde 2004 von TRIMBORN et al. [21] mittels Kopplungsanalyse das für PCC verantwortliche Gen identifiziert, welches sich als identisch mit dem *MCPH1*-Gen erwies. Die Sequenzierung des *MCPH1*-Gens bei den PCC-Patienten zeigte eine homozygote Insertion eines Adenosins in Exon 5, die in einer Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stoppcodon im Exon 6 resultierte. Das kodierende Protein würde lediglich die N-terminale BRCT-Domäne enthalten. So wurde mit der

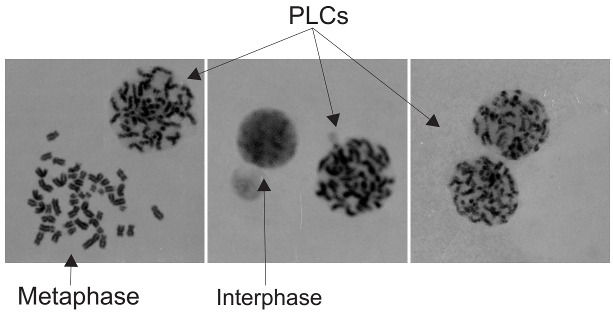


Abbildung 1.6 *PCC-Syndrom. Chromosomenpräparate von MCPH1-defizienten lymphoblastoiden Zellen. Die Chromosomen in Prophase-ähnlichen Zellkernen (PLCs) sind bereits stark kondensiert.*

[2] Stark kondensierte Chromosomen mit intakter Zellkernmembran.

Verbindung zum PCC-Syndrom der Phänotyp von MCPH-Patienten um ein Merkmal erweitert. Allerdings kommt das PCC-Syndrom nur bei Patienten mit Mutationen im *MCPH1*-Gen vor.

MCPH1-Struktur

Das *MCPH1*-Gen befindet sich in der subtelomeren Region des kurzen Arms von Chromosom 8. Die kodierende Sequenz (CDS, *coding sequence*) umfasst 2500 bp und ist auf 14 Exons verteilt (Abb. 1.7). Das entsprechende Protein besteht aus 835 Aminosäureresten, die eine N-terminale bzw. zwei C-terminalen BRCT-Domänen sowie eine Zwischenregion ausbilden. In der Zwischenregion, die größtenteils vom Exon 8 kodiert wird, sind außer

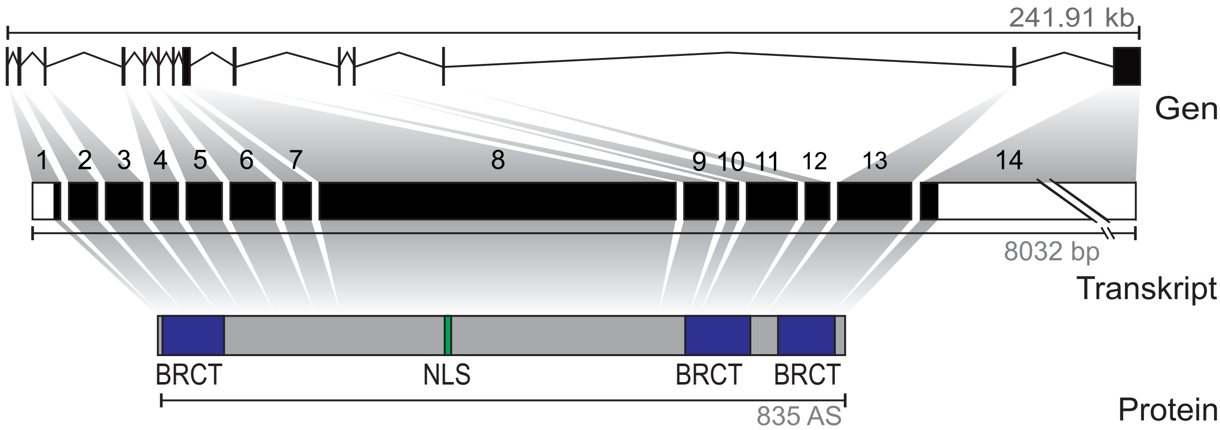


Abbildung 1.7 *MCPH1/Microcephalin-Struktur: schematische Darstellung des MCPH1-Gens, -Transkripts sowie -Proteins. Die Exonabschnitte sind im Transkript durch nummerierte Rechtecke gekennzeichnet. Der kodierende Bereich ist schwarz markiert. Die BRCT-Domänen und das Kernlokalisierungssignal (NLS) im Protein sind durch farbige Rechtecke gezeichnet.*

einer Kernlokalisierungssequenz (NLS, *nuclear localization signal*) keine erkennbaren funktionellen Domänen bzw. Strukturen vorhanden. BRCT-Domänen (*BRCA1 carboxyl-terminal*) wurden in einer Reihe von Proteinen gefunden, die an der DNA-Reparatur und/oder Zellzykluskontrolle beteiligt sind [34]. Dies gab Anlass, den mikrozephalen Phänotyp von MCPH1-Patienten mit einem gestörten Zellzyklus der neuronalen Vorläuferzellen bzw. mit einer erhöhten Apoptoserate wegen beeinträchtigter DNA-Reparatur während der Neurogenese zu erklären [19].

MCPH1-Funktionen

Eine lange Liste an Funktionen und Interaktionspartnern wurde MCPH1 zugeschrieben, die unter anderem mit der Zellzykluskontrolle, der DNA-Schadensantwort bzw. -reparatur

oder der Regulierung der Chromosomenkondensation in Verbindung stehen, wie in der Abb. 1.8 schematisch dargestellt ist. Einen ersten Hinweis auf die Beteiligung von Microcephalin bei der Zellzykluskontrolle lieferte der PCC-Phänotyp in Zellen von Patienten mit MCPH1-Mutationen. PCC resultiert aus einer vorzeitigen Chromosomenkondensation in der G2-Phase und einer verzögerten Dekondensation nach Abschluss der mitotischen Teilung [21]. Mittels RNA-Interferenz gegen *MCPH1*-mRNA konnte man bestätigen, dass MCPH1-Defizienz ursächlich für PCC ist [21]. Es wird daher angenommen, dass MCPH1 ein negativer Regulator der Chromosomenkondensation ist. Es konnte gezeigt werden, dass diese Regulation in Zusammenspiel mit Condensin II stattfindet [35]. Der zugrunde liegende Mechanismus bleibt jedoch ungeklärt. Es wird zum einen eine direkte Interaktion zwischen MCPH1 und Condensin II diskutiert, wodurch die vorzeitige Chromosomenkondensation unterdrückt wird. Zum anderen könnte MCPH1 die Rolle eines Signalfaktors

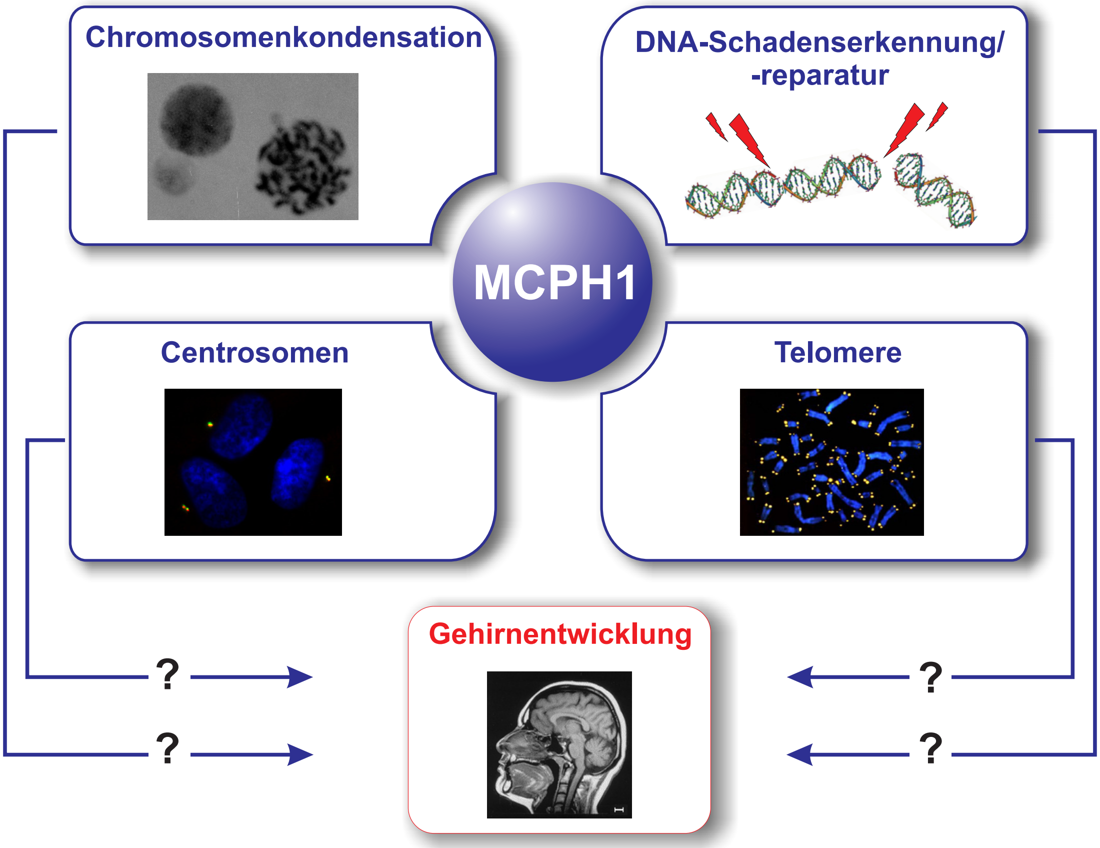


Abbildung 1.8 *Nachgewiesene und hypothetische Funktionen von Microcephalin. Einzelheiten sind noch nicht eindeutig geklärt.*

übernehmen, der antagonistisch zu Cyclin-A-CDK1-Kinase wirkt. Bei letzterer handelt es sich um eine mitotische Kinase, die Condensin II mittels Phosphorylierung aktiviert [36]. Eine alternative Erklärung für PCC lieferte die Beobachtung, dass in MCPH1-defizienten Zellen vermindert pY15-CDK1 in der späten S- und G2-Phase exprimiert wird [37]. CDK1

bildet mit Cyclin B den Kernbestandteil des MPF-Komplexes (*M-phase promoting factor*), welcher den Übergang der Zelle von der G2- in die M-Phase steuert. Die Phosphorylierung von CDK1 an Tyrosin 15 (pY15-CDK1) inaktiviert den MPF, während eine Dephosphorylierung durch CDC25-Phosphatase in einer MPF-Aktivierung resultiert. Man folgerte daraus, dass MCPH1 die vorzeitige Dephosphorylierung von pY15-CDK1 unterdrückt. Auch in diesem Fall steht die Aufklärung des genauen Wirkmechanismus aus. In der gleichen Studie vermuteten die Autoren eine Rolle von Microcephalin in dem ATR-abhängigen DNA-Schadensantwort-Signalweg *downstream* von CHK1, wodurch die CDC25A-Stabilität sowie der G2/M-Checkpoint-Arrest beeinflusst würden [37]. In einer Studie von Lin et al. [38] wurde die MCPH1-Funktion jedoch weiter *upstream* in diesem Signalweg platziert, da MCPH1 die Expression von *CHK1* sowie *BRCA1* regulieren soll. Außerdem wurde in jener Studie gezeigt, dass MCPH1-*knockdown* in einem defekten Strahlungs-induzierten Intra-S- und G2/M-Checkpointarrest resultiert. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde keine abnormale Expression von *CHK1* und *BRCA1* in MCPH1-Patientenzellen festgestellt [37]. Auch Rai et al. [39] glaubten eine Involvierung von MCPH1 in ATM- und ATR-abhängige Signalwege zu erkennen. Die gleiche Arbeitsgruppe vermutete in MCPH1 ein potentielles Tumorsuppressorprotein, da anomal reduzierte *MCPH1*-Expression bzw. -Gendeletionen in mehreren humanen Krebszelllinien festgestellt wurden [39]. Im Gegensatz dazu wurde kein erhöhtes Krebsrisiko bei den MCPH1-Patienten oder bei deren Eltern beobachtet [21, 28, 40, 41]. Weiterhin wurde mittels Immunprezipitation eine Interaktion von MCPH1 mit dem Transkriptionsfaktor E2F1 nachgewiesen [42]. Die Autoren der Studie vermuten, dass durch diese Interaktion die Expression von *CHK1*, *BRCA1* und weiteren Genen, die in DNA-Reparatur bzw. Apoptosewege involviert sind, reguliert wird. Die Liste von möglichen MCPH1-Funktionen wurde durch Befunde an Mcph1-defizienten embryonalen Mausfibroblasten (MEF) erweitert. Dabei fand man, dass die Interaktion zwischen MCPH1 und Condensin II für eine effiziente DNA-Reparatur nach dem Prinzip der homologen Rekombination entscheidend ist [43]. Als eine weitere Funktion soll MCPH1 durch die Interaktion mit dem Telomer-spezifischen Protein TRF2 (*telomeric repeat binding factor 2*) die Länge der Telomere sowie die Telomer-spezifische DNA-Schadensantwort regulieren [44]. Schließlich soll MCPH1 laut den Ergebnissen zweier weiteren Arbeitsgruppen an Centrosomen lokalisiert sein [45, 46]. Dabei soll einerseits der mitotische Spindelaufbau und die Cytokinese über die Regulierung der Stabilität der mitotischen Kinasen Aurora A sowie PLK1 (*polo-like kinase 1*) kontrolliert werden [45]. Anderseits trage MCPH1 zu der centrosomalen Lokalisierung von PCNT (Pericentrin) bei und rekrutiere ebenfalls CHK1 zu den Centrosomen [46].

Eine mögliche Erklärung für diese Plethora an Funktionen und Interaktionspartnern wäre die Existenz mehrerer Isoformen von Microcephalin. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bekräftigt, dass das *MCPH1*-orthologe Gen von *Drosophila* zwei alternativ gespleißte Varianten exprimiert [47]. Alternatives Spleißen ist ein äußerst effektiver Prozess, der in proteomischer Diversität resultiert. Im folgenden Abschnitt soll näher auf die RNA-Prozessierung und Mechanismen des alternativen Spleißens eingegangen werden.

1.3 Spleißvorgänge

1.3.1 Prozessierung der prä-mRNA

Die in der DNA gespeicherte Information Protein-kodierender Gene wird zuerst in Form einer RNA übersetzt, die dann als Vorlage für die Proteinbiosynthese dient und daher als mRNA (*messenger* RNA) bezeichnet wird. Bevor ein Gen-Transkript aus dem Zellkern transportiert wird, unterliegt es einem Reifungsprozess, welcher aus drei Ereignissen besteht: Capping, Spleißen und Polyadenylierung. Dabei handelt es sich um gekoppelte Reaktionen, die sich gegenseitig beeinflussen. Der erste Schritt der Prä-mRNA-Prozessierung, der als Capping bezeichnet wird, findet bereits nach der Synthese der ersten 20 – 30 Nukleotide statt. Dabei hydrolysiert die RNA-5'-Triphosphatase (RTP) die Triphosphatgruppe des ersten Nukleotids der naszierenden RNA zu einem Diphosphat. Darauf folgend katalysiert die Guanylyltransferase (GT) unter Beteiligung von GTP die Bindung eines GMP-Restes an das erste Nukleotid über eine 5'-5'-Triphosphatbindung. Schließlich wird die N7-Position des transferierten GMP durch eine Methyltransferase (MT) methyliert. Während in Säugerzellen die Triphosphatase- und die Guanylyltransferase-Aktivitäten von N- bzw. C-terminalen Bereichen eines und demselben Polypeptids ausgehen, werden diese in der Hefe von zwei Enzymen katalysiert. Die Cap-Struktur wird von einem Cap-Bindungskomplex (CBC) erkannt, welcher nach dem Transport der mRNA durch die Zellkernporen von dem cytoplasmatischen Translationsinitiations-Faktor eIF-4E ersetzt wird (Übersicht in [48]). Es wird angenommen, dass die Bindung von CBC an die Cap-Struktur zur Stabilität der mRNA beiträgt, da dadurch deren 5'-Ende vor 5'-3'-Exonukleasen geschützt wird [49].

Da die Information in Genen höherer Eukaryonten durch nicht-codierenden Sequenze (Introns) unterbrochen ist, müssen diese aus der Prä-mRNA herausgeschnitten und die codierenden Sequenzen (Exons) miteinander verspleißt werden. Dieser Vorgang wird von einer Reihe von *cis*-Elementen gesteuert, die in der prä-mRNA vorhanden sind. Dabei weist die 5'-Exon-Intron-Grenze (5'-Spleißstelle oder 5'SS, durch ":" kennzeichnet) eine Consensus-Sequenz AG:GURAGU (R = Purin) auf, während das Ende eines Introns (3'-Spleißstelle

oder 3'SS) durch die Sequenz $(Y)_{10}$NYAG:RNNN (Y = Pyrimidin, N = beliebiges Nukleotid) definiert wird (Abb. 1.9). 20 – 50 Nukleotide in 5'-Richtung von der 3'SS liegt die Verzweigungsstelle (BB, *branch point*) YNCUR**A**Y mit hoch-konserviertem Adenosin [50].

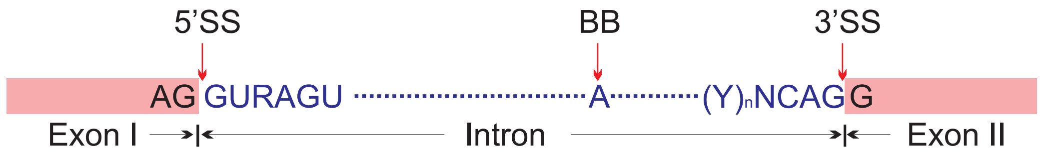


Abbildung 1.9 *Spleißsignale. Die Intron-Exon-Grenzen werden durch Consensus-Sequenzen an 5'- bzw. 3'-Spleißstellen markiert. BB: Verzweigungsstelle mit dem konservierten Adenosin. R=Purin; Y=Pyrimidin; N=beliebiges Nukleotid.*

Das Spleißen findet in zwei Schritten statt. Als erstes reagiert die 2'-OH-Gruppe eines Adenylatrestes der Verzweigungsstelle mit der 5'SS. Durch die Transesterifizierung entsteht ein freies Ende des vorangehenden Exons sowie ein Lasso-förmiges Molekül bestehend aus der intronischen Sequenz und dem nachfolgenden Exon. Im nächsten Schritt greift das 3'-OH-Ende des freien, aufwärts liegenden Exons die 3'SS an mit dem Resultat einer Verbindung der beiden Exons durch Transesterifizierung und Freisetzung des Introns [51]. Deswegen wird die 5'SS als Donor- und die 3'SS als Akzeptorstelle bezeichnet. Die beschriebenen Reaktionen werden von Spleißosomen katalysiert, die multimolekulare Komplexe darstellen und schrittweise aus Ribonukleoproteinpartikeln (snRNPs, *small nuclear ribonucleoprotein particles*) sowie nicht-snRNP-Faktoren zusammengesetzt werden. snRNPs bestehen aus Uridin-reichen RNA-Molekülen (UsnRNA, *uridine-rich small nuclear RNA*: U1, U2, U4, U5 und U6) und mehreren Proteinkomponenten. Interaktionen zwischen snRNPs und Prä-mRNA vermitteln die korrekte Erkennung der Spleißstellen sowie das Herausschneiden der Introns [52]. Dabei spielt die Bindung des U1-snRNP an die 5'SS eine entscheidende Rolle für die Initiation des Aufbaus eines Spleißosoms. Die Erkennung der 5'SS erfolgt über eine Basenpaarung des 5'-Endes der U1-snRNA mit der Consensus-Sequenz an der 5'SS. Für die Bindungstabilität der U1-snRNP spielt die Komplementarität mit der 5'SS-Sequenz und die Summe der Wasserstoffbrücken zwischen U1-snRNA und 5'SS eine Rolle [53]. Hinzu kommen weitere, *trans*-agierenden Faktoren, die den Spleißvorgang beeinflussen. Die am besten erforschten Spleißregulatoren gehören zu der SR-Proteinfamilie (*serine- and arginine-rich*) bzw. zu den hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*). SR-Proteine aktivieren das Spleißen, indem sie an exonische Sequenzen der Prä-mRNA binden und die Komponenten des Spleißosoms zu der Spleißstelle befördern [54]. hnRNPs hingegen unterdrücken das Spleißen durch antagonistische Bindung an Spleißerkennungsstellen [55].

Mit einigen wenigen Ausnahmen besitzen alle Protein-kodierenden mRNAs in höheren Eukaryonten eine Abfolge aus bis zu 200 Adenylatresten. Die Polyadenylierung einer mRNA findet in zwei Schritten statt, indem die Prä-mRNA spezifisch an der Polyadenylierungsstelle (PolyA-Stelle) endonukleolytisch gespalten und der Adenosinschwanz synthetisiert wird [56]. Ein großer Komplex aus mehreren Faktoren, die ihrerseits aus verschiedenen Proteinuntereinheiten bestehen, ist für die Polyadenylierungsreaktion notwendig. Dabei spielt CPSF (*cleavage/polyadenylation specifity factor*) in Zusammenarbeit mit CstF (*cleavage stimulation factor*) sowie PAP (*polyA polymerase*) bei der spezifischen Spaltung und Polyadenylierung eine entscheidende Rolle [57]. Die Nukleotidsequenz in der Umgebung der PolyA-Stelle enthält mehrere *cis*-Elemente, welche die Spaltungs- bzw. Polyadenylierungsposition markieren und an der Rekrutierung der Polyadenylierungsmaschinerie maßgeblich beteiligt sind. So liegt der Spaltungspunkt bei den meisten mRNAs zwischen dem PolyA-Signal AAUAAA oder AUUAAA und einem U- bzw. GU-reichem Motiv DSE (*downstream sequence element*) [58]. Diese zwei Elemente und deren Entfernung zueinander spezifizieren nicht nur die Spaltungs- bzw. Polyadenylierungsposition, sondern bestimmen genauso die PolyA-Signalstärke [57].

1.3.2 Mechanismen des alternativen Spleißens

Die Erkennung von Spleißstellen und der Spleißvorgang selbst erfolgen mit einer hohen Präzision. Trotzdem machen die Flexibilität des spleißosomalen Komplexes und die Komplexität des Spleißvorgangs das Spleißen durch weitere Faktoren leicht beeinflussbar. So hängt z.B. das Herausschneiden bestimmter Introns von der Transkriptionsrate ab [59]. Auch wird die Zugänglichkeit der Spleißosomkomponenten zu den Spleißstellen von der sekundären Struktur einer Prä-mRNA beeinflusst [60]. Dadurch können einzelne Exons herausgespleißt bzw. intronische Bereiche unterschiedlich häufig in die reife mRNA einbezogen werden. Dieser Prozess, der als alternatives Spleißen (AS) bezeichnet wird, betrifft die Mehrheit der Säuger-Gene und trägt zu einer proteomischen Diversität in diesen Organismen bei trotz einer relativ limitierten Genomgröße [61]. In einer typischen multiexonischen mRNA kann das Spleißmuster auf verschiedene Weise variieren [62]. Die meisten Exons sind konstitutiv, d.h. die sind immer in der reifen mRNA enthalten. Die alternativen Exons, die man als Kassettenexons bezeichnet, werden dagegen nur in bestimmte mRNA-Varianten eingebaut. Des weiteren können durch die Benutzung einer alternativen 5'SS bzw. 3'SS intronische Sequenzen exonisiert werden bzw. die Exons verkürzt werden. Neben alternativem Spleißen kann auch die Transkriptionsinitiation an unterschiedlichen Startstellen stattfinden und in Transkripte mit alternativen 5'-Enden resultieren. Analog dazu können unterschiedliche PolyA-Signale Transkripte mit alternativen 3'-Termini

erzeugen. Schließlich kann das Herausschneiden einer intronischen Sequenz unterdrückt werden, sodass diese in der reifen mRNA verbleibt. Die Abb. 1.10 illustriert die Arten von AS. Viele Gene verwenden eine Kombination aus verschiedenen Modi von AS, wodurch eine Vielzahl an Transkript-Varianten entstehen kann. Ein spektakuläres Beispiel stellt das *Drosophila*-Gen *Dscam* (*Down syndrome cell adhesion molecule*) dar, welches 95 Exons enthält und bis zu 38 016 unterschiedliche mRNA-Isoformen generieren kann – eine Zahl, welche die Gesamtzahl der Gene in diesem Organismus (~14 500) weit übersteigt [63].

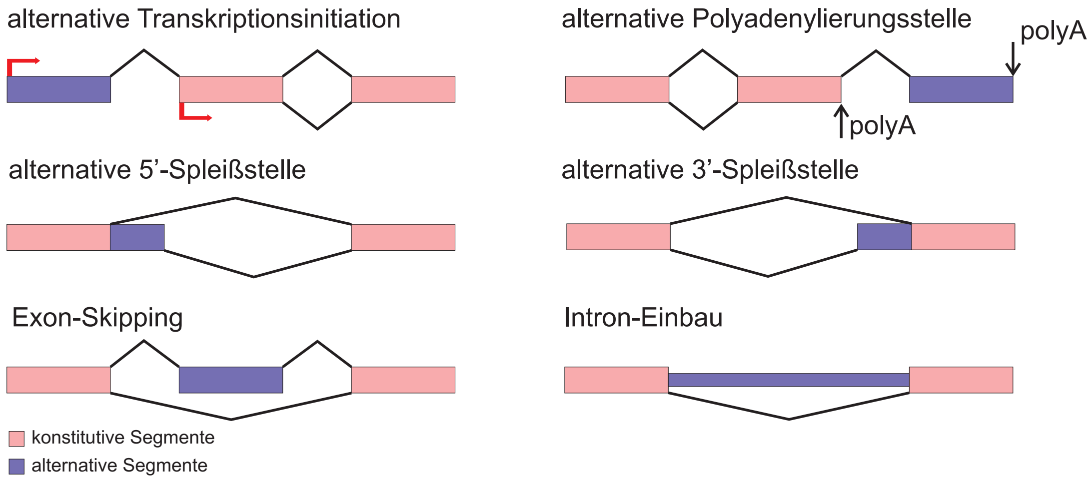


Abbildung 1.10 *Arten des alternativen Spleißens. Durch Rechtecke sind mRNA-Segmente dargestellt, deren eventuelle Kombinationen in der reifen mRNA durch Linien angedeutet sind. Durch rote Pfeile sind die Transkriptionsstartstellen gezeigt, schwarze Pfeile verweisen auf Polyadenylierungsstellen.*

AS kann zur Funktionsänderung eines Proteins führen. Durch AS kann ein Teil zur Peptidsequenz zugefügt bzw. von ihr entfernt werden, wodurch die Stabilität, funktionelle Domänen, die zelluläre Lokalisation oder eine spezifische Aktivität des Proteins beeinflusst werden können [64]. Alternative nicht-kodierende Sequenzen (UTRs) können den mRNA-Export aus dem Zellkern und deren cytoplasmatische Lokalisierung sowie die Translationseffizienz und die Stabilität einer mRNA beeinträchtigen [65]. Bestimmte Spleißereignisse können durch Leserasterverschiebung und Auftreten von prämaturen Stoppcodons die Degradation einer mRNA durch den sogenannten *nonsense-mediated mRNA decay* verursachen [66]. Dadurch übernimmt das Spleißen eine Rolle in der Regulation der Gen-Expression.

Es bleibt häufig unklar, wie konstant ein AS ist, d.h. ob die multiplen Isoformen in gleichen Verhältnissen in allen Zelltypen exprimiert werden. Die meisten ausführlich untersuchten Fälle von AS betreffen reguliertes AS. Die Regulierung kann Gewebe-, Entwicklung- bzw. Differenzierung-spezifisch sein. Zusätzlich können einige Muster von AS durch externe

Reize (z.B. Depolarisierung der Nervenzellen) oder durch Signalübertragungskaskaden ausgelöst werden [62]. Die biochemischen Mechanismen, welche die Wahl der Spleißstellen und damit das AS steuern, sind komplex und zum größten Teil wenig verstanden [67]. Obwohl die Spleißstellen in einer Prä-mRNA der Spleißmaschinerie generell als Marker dienen, sind diese Sequenzelemente in höheren Eukaryonten degeneriert. Daher ist es nicht überraschend, dass in Introns, die mehrere Tausend Nukleotide lang sein können, ähnliche Elemente wiederholt vorkommen und mit kanonischen Spleißstellen um die Bindung der spleißosomalen Komponenten konkurrieren können. Andere *cis*-agierende Sequenzelemente in exonischen und in intronischen Bereichen begünstigen entweder die Einbeziehung eines Exons (ESE, *exonic splicing enhancer*) oder wirken dieser entgegen (ESS, *exonic splicing silencer*) [68]. So unterliegt die Verwendung eines Exons einer kombinatorischen Kontrolle durch mehrere regulatorische Elemente in der Prä-mRNA einschließlich der Stärke der flankierenden Spleißstellen [69]. Während einige dieser regulatorischen Sequenzen direkt am Aufbau der Sekundärstrukturen der RNA beteiligt sind, wodurch die Zugänglichkeit der Spleißstellen beeinflusst werden kann [60], dient die Mehrheit als Bindungsplattform für regulatorische nicht-snRNP-Faktoren. ESEs rekrutieren SR-Proteine, welche dann die Erkennung der angrenzenden Spleißstellen fördern. ESSs unterdrücken dagegen das Spleißen an der nächstliegenden Spleißstelle durch Interaktion mit hnRNPs [68]. Im Endeffekt kommt eine "Entscheidung" hinsichtlich des Spleißens an einer bestimmter Stelle durch ein Überwiegen Spleiß-fördernder bzw. -hemmender Faktoren zustande. Die differentielle Expression solcher Faktoren führt zur differenziellen Expression einer der Spleißvarianten in bestimmten Zelltypen bzw. Entwicklungsstadien.

In einigen molekularen Modellen wird AS mit der Transkription in Verbindung gebracht, wobei Promotoren oder die RNA-Polymerase zur Rekrutierung von Spleißfaktoren wie der SR-Proteine beitragen könnten [70]. Die Elongationsgeschwindigkeit eines Transkripts scheint ebenfalls das AS zu beeinflussen. Mechanistisch gesehen geschieht das über die Zeit, die einer Prä-mRNA zur Verfügung steht, um nach der Transkription Sekundärstrukturen aufzubauen. So korreliert die Syntheserate einer RNA mit der Präsentation der Zielsequenzen für Spleißfaktoren. Anderseits spielt dabei auch die Spleißstellenstärke eine Rolle (Abb. 1.11). Es wurde beobachtet, dass das T-Antigen (T-Ag) von *SV40* und der virale Transkriptionsaktivator VP16 einen gegensätzlichen, von der SR-Proteinen unabhängigen Einfluss auf das AS haben [71]. In jener Studie fand man heraus, dass das T-Ag die Prozessivität der RNA-Polymerase II (Pol II) hemmt und gleichzeitig die Einbeziehung des alternativen EDI-Exons in *Fibronectin*-mRNA erhöht. VP16 dagegen stimuliert die Geschwindigkeit der Elongation durch Pol II, während die Einbeziehung des EDI-Exons in die reife RNA gehemmt wird. Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass die niedrige Pol II-Geschwindigkeit die Erkennung des Introns vor dem EDI-Exon trotz der

schwachen 3'SS begünstigt, da zunächst keine weitere 3'SS vorhanden ist. Ist aber die Pol II-Prozessivität hoch, dann konkurriert die stärkere 3'SS des nächsten Introns mit der schwächeren 3'SS des vorangehenden Introns mit der Folge, dass das EDI-Exon geskippt wird [71].

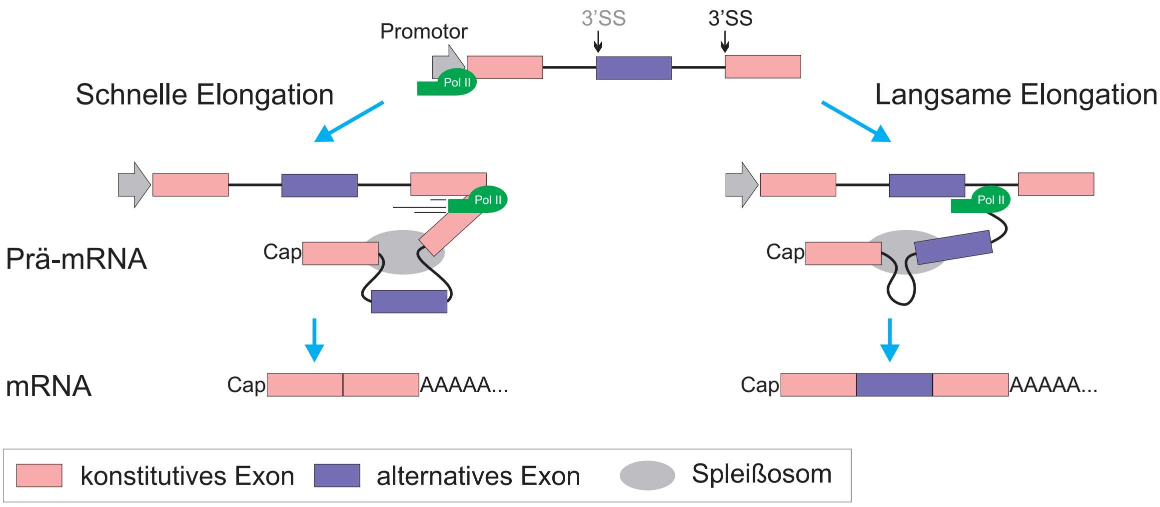


Abbildung 1.11 *Modell zur Regulierung des alternativen Spleißens durch die Elongationskinetik der Polymerase II. Das alternative Exon folgt einem Intron mit einer schwächeren 3'SS als die des folgenden Introns. Eine niedrige Elongationsgeschwindigkeit favorisiert den Einbau des alternativen Exons, während eine hohe Geschwindigkeit zum Skippen dieses Exons führt.*

Mehr als die Hälfte der menschlichen Gene enthält multiple PolyA-Stellen, die potentiell in Transkripte mit alternativen 3'-Enden resultieren [72]. Es gibt mehr Hinweise, dass Spleißen und Polyadenylierung gekoppelte Prozesse sind und kotranskriptionell stattfinden [73]. Eine Reihe von Genen "verwendet" alternatives Spleißen und alternative Polyadenylierung, um diverse Transkripte zu produzieren. Ein gut untersuchtes Beispiel ist das Gen, welches für die schwere Kette des Immunglobulins M (IgM) kodiert. Die Verwendung einer internen PolyA-Stelle resultiert in der sekretorischen IgM-Isoform. Wird dagegen das Intron, welches dieses PolyA-Signal enthält, heraus gespleißt, wird die nächstfolgende PolyA-Stelle verwendet. Dies führt zu einer Membran-gebundenen IgM-Variante [74]. Das Verhältnis der beiden Isoformen ändert sich während der Reifung der B-Lymphozyten. Bei diesem Vorgang scheint die Stärke der 5'SS eine Rolle zu spielen. Die Introns mit einer alternativen PolyA-Stelle haben gewöhnlich eine suboptimale 5'SS [72]. Offensichtlich hängt die Verwendung von alternativen PolyA-Stellen davon ab, wie effektiv die relevanten Introns heraus gespleißt werden. Diese Beispiele verdeutlichen , wie komplex die Prozessierung von Prä-mRNA vernetzt ist.

1.4 Fragestellung

Biallelische Mutationen im *MCPH1*-Gen führen zur nicht-syndromalen primären Mikrozephalie in Kombination mit dem PCC-Syndrom. Dieses äußert sich in einer gestörten Regulierung der Chromosomenkondensation während des Zellzyklusablaufs. Seit der Erstbeschreibung von *MCPH1* im Jahre 2002 wurden zahlreiche Versuche unternommen, die genaue Funktion des *MCPH1*-Genprodukts, Microcephalin, aufzuklären. Die Ergebnisse gaben Hinweise auf eine Vielzahl von Funktionen, an denen MCPH1 beteiligt sein soll. Eine Erklärung für die postulierte große Anzahl unterschiedlicher Microcephalin-Funktionen wäre die Existenz mehrerer MCPH1-Isoformen. Bis *dato* sind jedoch keine Studien bekannt, in denen die Expression von *MCPH1* systematisch untersucht wurde. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit die Existenz und die Expression möglicher *MCPH1*-Spleißvarianten geprüft werden. In die Arbeit einbezogen werden sollten Untersuchungen zur *MCPH1*-Promotorregion, zur intrazellulären Lokalisation von MCPH1 und zu dessen ektopischer Expression. Ferner sollten Studien zur Komplementation MCPH1-negativer Zelllinien mit wildtyp- und varianten Formen von MCPH1 durchgeführt werden. Schließlich sollte die Rolle von MCPH1 bei der DNA-Schadensantwort beleuchtet werden.

2 Materialien

2.1 Zelllinien

2.1.1 Kompetente Bakterienstämme

Bezeichnung	**Quelle**
One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli	Invitrogen
SURE® 2 Supercompetent Cells	Stratagene
StrataClone SoloPack Competent Cells	Stratagene
JM110	Stratagene
Turbo Competent E. coli	NEB

2.1.2 Langzeitzellkulturen

Bezeichnung		**Quelle**
HeLa	Zervixkarzinom-Epithelzellen	DZSM
HEK-293	Embryonale Nierenzellen	ATCC
U2OS	Osteosarcoma-Epithelzellen	ATCC
COS-7	Fibroblasten aus Nierengewebe	ATCC

Die unten aufgelisteten MCPH1-defizienten Zelllinien wurden von Frau Prof. Dr. H. Neitzel (Berlin) überlassen.

562T	T-Antigen-transformierte Hautfibroblasten (MCPH1-Mutation c.dup427A)
562, 563	EBV-transformierte lymphoblastoide Zellen (MCPH1-Mutation c.dup427A)
135	EBV-transformierte lymphoblastoide Zellen (MCPH1-Mutation c.80C>G)
657	EBV-transformierte lymphoblastoide Zellen (MCPH1-Mutation c.74C>G)

2.2 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Restriktionsenzyme	NEB, Fermentas, Gibco
T4-DNA-Ligase	NEB
CIP	NEB
PfuUltra® High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene
DNase I recombinant, RNase-free	Roche
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Crimson *Taq* DNA Polymerase	NEB

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre Antikörper

Spezifität	Artikel-Nummer	Hersteller
MCPH1	ab2612	Abcam
	AF3998	R&D
GAPDH	ab9385	Abcam
Fibrillarin	ab18380	Abcam
TPX2	ab32795	Abcam
CDK5RAP2	IHC-00063	Bethyl
GFP	ab6662	Abcam
	G1544	Sigma
Histone H3 (pS10)	#9708	Cell Signaling
	#9706	Cell Signaling
p84	ab487	Abcam
γ-Tubulin	T5192	Sigma
α-Tubulin	ab40742	Abcam
γH2AX	ab11174	Abcam
Pericentrin	ab4448	Abcam
BrdU	B8434	Sigma
	ab6326	Abcam

2.3.2 Sekundäre Antikörper

HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper wurden von GE Healthcare bezogen. Alexa Fluor®-gekoppelte sekundäre Antikörper stammten von Molecular Probes.

2.4 Plasmide

Bezeichnung	Quelle
S11IN	Prof. Dr. H. Hanenberg
pCL1THPC	Prof. Dr. H. Hanenberg
puc2CL1KRABIN	Prof. Dr. H. Hanenberg
pCL1H	Prof. Dr. H. Hanenberg
pUC18	Stratagene
pSC-B-amp/kan	Stratagene
pEGFP-N3	Clontech
pGL3	Promega

2.5 Primer

Primer wurden von den Firmen Tib Molbiol, Sigma Genosys sowie PrimerDesign erworben. Die Sequenzen sind im Anhang aufgelistet. Zur Herstellung von Stammlösungen (100 µM) wurden die lyophilisierten Produkte in ddH_2O gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Primer wurden mit der Hilfe der Software *Multiple primer analyzer* (Finnzymes) entworfen. Das Programm benutzt zum Berechnen der Schmelztemperaturen die *nearest-neighbor*-Methode nach Breslauer et al. [76].

2.6 Längenstandards

Bezeichnung	Hersteller
100 bp & 1 kb DNA Ladder	NEB
FastRuler™ DNA Ladders, ready-to-use	Fermentas
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas
Precision Plus Protein™ Standards, All Blue	BioRad

2.7 Chemikalien und Reagenzien

Die üblichen, hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Merck, Roth sowie Sigma in p.A. Qualität bezogen.

Bezeichnung	Hersteller
Acid phenol:chloroform	Ambion
Agarose, Phor	Biozym
Ampicillin	AppliChem
Aqua ad iniectabilia	Braun
Bio-Rad Protein Assay	BioRad
DMSO	AppliChem
BrdU	Sigma
DAPI	Molecular Probes
dNTP Set (100 mM)	Thermo Scientific
Doxycyclin	Sigma
Fötales Kälberserum, FCS	Sigma
Giemsa-Farblösung	PAA Laboratories
HiDi™ Formamide	Applied Biosystems
Kanamycin	Sigma
MEM + GlutaMAX™-I	Gibco
Nocodazol	AppliChem
PBS (x10)	PAA Laboratories
PenStrep	Gibco
Poly-(L)-Lysin	Sigma
Puromycin	AppliChem
RPMI 1640 + GlutaMAX™-I	Gibco
Thymidine	Sigma
Trypsin (5 %)	Gibco

2.8 Puffer und andere Lösungen

Aufgelistet sind im Labor hergestellte Lösungen.

Einfriermedium 80 % RPMI-Medium; 10 % FCS; 10 % DMSO

Fixativ 75 % Methanol; 25 % Essigsäure

SE-Puffer, pH8,0 75 mM $NaCl_2$; 25 mM Na_2EDTA

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl; 1 mM Na_2EDTA

TBE-Puffer, 10x 890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA

DNA-Probenpuffer, 6x 40 % (w/v) Sucrose; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol

Extraktionspuffer 50 mM Tris; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 25 mM FNa; 0,1 mM Na_3VO_4; 150 mM NaCl; 25 mM β-Glycerophosphat; 0,2 % (v/v) TritonX; 0,3 % (w/v) Np40; 1 Tabl./10ml Protease-Inhibitoren *Complete*, Roche

Stripping-Puffer 62,5 mM Tris (pH 6,7); 2 % (w/v) SDS; 100 mM β-mercaptoethanol

PBST 1x PBS; 0,05 % (v/v) Tween®20

2.9 Kit-Systeme

Bezeichnung	Hersteller
DNA Clean & Concentrator™-25/-5 Kit	Zymo Research
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
TURBO DNA-free™	Ambion
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
PerfeCta™SYBR® Green SuperMix for iQ™	Quanta
FirstChoice® RLM-RACE Kit	Ambion
StrataClone™ Blunt PCR Cloning Kit	Stratagene
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Nuclear/Cytosol Extraction Kit	BioVision
Lumigen™ PS-3 detection reagent	Amersham Biosciences
ChemiGlow West	Alpha Innotech
Effectene® transfection reagent	Qiagen
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega

2.10 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
NuPAGE® Novex® Bis-Tris bzw. Tris-Acetate Gele	Invitrogen
Deckgläschen, Ø 12 mm	Sarstedt
Multiwell-Platten	Greiner bio-one
Zellkulturflaschen	Corning
Glaspipetten	Brand
Pipettenspitzen	Sarstedt
Schraubdeckelröhrchen	Sarstedt
Petrischalen	Greiner bio-one

2.11 Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Sequenzierer	ABI Prism 300 Genetic Analyser	PE Biosystems
Analysenwaage	MC 1	Sartorius
FACS	BD LSR II	BD Bioscience
Inkubatoren	Schüttelinkubator	Infors HAT
	Brutschrank	Heraeus
Mikroskope	Axiovert 40C	Zeiss
	Axiovert 200M	Zeiss
Luminometer	Mithras LB940	Berthold Technologies
Elektrophorese	Horizontale Gelelektrophorese	OWL
	Compact M	Biometra
	XCell SureLock™	Invitrogen
Netzgerät	Model 200/2.0	BioRad
Proteintransfer	XCell II™ Blot Module	Invitrogen
	BlueBlot Wet/100	Serva
Zentrifugen	Megafuge 1.0	Heraeus
	Multifuge 1 L-R	Heraeus
	Tischzentrifuge	Hettich
	Centrifuge 5415C	Eppendorf
Vortex	Genie 2	Scientific Industries
Vakuumkonzentrator	BA-VC-300 H	Bachofer
Vakuumpumpe	MZ 2C	ABM
Thermocycler	iCycler iQ	BioRad
	Mastercycler epgradientS	Eppendorf
	T3000	Biometra
Geldokementation	Fluor-Chem® HD2	Alpha Innotech
Magnetrührer	Nuova II	Bioblock Scientific
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Taumelschüttler	REAX 3	Heidolph
Wasserbad	Typ B	Lauda
Pipettierhilfe	Mikropipetten	Gilson
	Mehrkanalpipetten	Brand
	Pipetboy	Integra Biosciences

2.12 Software und Internetprogramme

Adobe Photoshop CS Adobe Systems

AlphaEaseFC Alpha Innotech

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/

CorelDRAW Graphics Suite X3 Corel

Cylchred 1.0.0.1 freie Software

EndNote X2 Thomson

Excel 2007 Microsoft

Gene2Promoter http://www.genomatix.de

Gene Runner v. 3.05 Hastings Software

LyX v.1.6.5 freie Software

MicroInspector http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/

Multiple primer analyzer http://www.finnzymes.fi

NNSPLICE 0.9 http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

polyadq http://rulai.cshl.org/tools/polyadq/polyadq_form.html

PSORT II http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html

Screen 3.4 http://www.uni-duesseldorf.de/rna/html/hbond_score.php

SigmaPlot v. 11 Systat Software, Inc.

Vector NTI Invitrogen

WinMDI 1.9. freie Software

2.13 Datenbanken

ASTD 1.1 http://www.ebi.ac.uk/astd

NCBI-GenBank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

polyA DB.2 http://polya.umdnj.edu/polya_db2/

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Suspensions-Zellen

EBV (*Epstein-Barr-Virus*)-transformierte lymphoblastoide Zelllinien (B-LCL, *B-lymphoblast cell line*) wurden in T25-Zellkulturflaschen kultiviert. *RPMI-1640*-Nährmedium wurde mit inaktiviertem FCS (15 % Endkonz.) angereichert und je nach Zellwachstum 1 – 2 Mal pro Woche zu 3/4 des Kulturvolumens ausgetauscht. Die Zellen wurden in Begasungsbrutschränken bei 37 °C, 96 – 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % (v/v) CO_2 inkubiert.

3.1.2 Adhärente Zellen

HeLa-, HEK293-, U2OS- und COS-7-Zelllinien sowie mittels T-Antigen transformierte Fibroblasten 562T wurden in *MEM*-Medium kultiviert, welches 10 % FCS und 1 % PenStrep-Lösung enthielt. Dieses Nährmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Bei einer Zelldichte von über 90 % wurden die Zellen auf mehrere Flaschen aufgeteilt. Dabei wurde das komplette Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und durch Inkubation mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 % [v/v]) für 5 min bei 37 °C vom Flaschenboden abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in frischem Nährmedium resuspendiert. Aliquots von jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden in neue Zellkulturflaschen überführt und mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt. Die Inkubationsbedingungen waren dieselben wie bei Suspensions-Zellen. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Arbeitsbank durchgeführt.

3.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Etwa 2×10^6 suspendierte Zellen wurden durch Zentrifugation (150 g, 5 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1,8 ml vorgekühltem (4 °C) Einfriermedium aufgenommen, in ein steriles Kryoröhrchen überführt und in einem Isopropanol-Einfriergefäß für mindestens. 12 h bei -70 °C in einem Tiefkühlgerät gelagert. Die Röhrchen wurden dann in Lagertanks in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt. Zur Wiederverwendung wurden Röhrchen mit den gefrorenen Zellaliquots in einem Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut und in Reagenzröhrchen mit 8 ml Zellkulturmedium (37 °C) überführt. Die Zellen wurden pelletiert und das Zellkulturmedium erneuert, um das in Einfriermedium enthaltenes Kryoprotektiv DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zellzählungen wurden mit Hilfe einer Zählkammer vom Typ Fuchs-Rosenthal durchgeführt.

3.1.5 Synchronisation von HeLa-Zellen

Um den Zellzyklus von HeLa-Zellen zu synchronisieren, wurde die Methode des doppelten Thymidin-Blocks angewendet [75]. Dabei wird die Synchronisation durch Thymidin-Zugabe in das Nährmedium erreicht, da der Überschuss von Thymidin in der Blockade der DNA-Replikation resultiert. Pro T75-Zellkulturflasche mit $0,5 \times 10^6$ Zellen wurde am Tag nach der Aussaat Thymidin (2 mM Endkonz.) zugegeben. In Anwesenheit von Thymidin wurden die Zellen 18 h lang inkubiert, um den Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase zu blocken. Nach diesem ersten Block wurde das Thymidin-haltige Nährmedium durch Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden in frischem Medium ohne Thymidin für 9 h inkubiert, woraufhin erneut Thymidin (2 mM) zugegeben wurde. Nach Ablauf von 17 h wurden die Zellen gewaschen und in Thymidin-freiem Medium inkubiert. In bestimmten Zeitpunkten (je nach Experimenterfordernissen) nach dem zweiten Block wurden die Zellen geerntet. Die Synchronizität der Zellen wurde nach DAPI-Färbung der DNA mittels zellzyklusanalytischer Durchflusszytometrie überprüft.

3.2 Gentransfer

3.2.1 Transfektion

Zur transienten Expression von *MCPH1*-Varianten mit mutierten NLS-Sequenzen wurden 5×10^5 COS-7- bzw. HeLa-Zellen pro T25-Zellkulturflasche in 5 ml MEM-Komplettmedium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2 µg eines entsprechenden Plasmids und 6 µl *GeneJuise® Transfection Reagent* (Novagen) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 5 h wurde das Nährmedium erneuert und 48 h später wurden die Zellen zur Zellfraktionierung bzw. für Immunfluoreszenzversuche weiterverwendet.

Im Rahmen von Promotorstudien mittels *Dual-Luciferase-Reporter-Assays* wurde für die Transfektion von Reportergenkonstrukten der *Effectene Transfektion Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro *well* einer 12-*well*-Platte ausgesät und für 20 h in 2 ml MEM-Komplettmedium inkubiert, um am Tag der Transfektion eine Kultur mit einer Konfluenz von ca. 80 % zu erhalten. Zur Transfektion wurden zuerst 600 ng eines der pGL3-Reportergenvektoren und 300 ng des pRP-SV40-Plasmids mit 225 µl *EC-Buffer* und 3 µl *Enhancer* gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl *Effectene*-Reagenz wurde die Transfektionslösung 10 sec lang mit einem Vortex-Gerät gemischt und dann für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 800 µl MEM-Medium zugegeben. Jeweils 400 µl dieser Lösung wurden auf die Zellen eines *wells* gleichmäßig verteilt, die zuvor mit PBS gewaschen und mit 0,8 ml MEM-Medium versetzt worden waren. Nach 24 h wurde das Nährmedium erneuert und weitere 24 h später wurde der Luciferase-Assay durchgeführt (s. Abschnitt 3.8).

3.2.2 Retrovirale Transduktion

Die Verpackung von lentiviralen Plasmiden und die retrovirale Transduktion fanden im Labor von Herrn Prof. Dr. H. Hanenberg (Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) statt. 48 h nach der Transduktion wurden mit der Selektion transduzierter Zellkulturen in Medium mit 200 µg/ml Hygromycin B begonnen. Anschließend erfolgte eine Selektion mit 500 µg/ml G418.

3.3 Chromosomenpräparation

Zur Chromosomenpräparation wurden kultivierte Zellen sedimentiert (5 min, 150 g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml 0,4 % KCl-Lösung (37 °C) resuspendiert und die Suspension für 10 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert (hypotonische

Behandlung). Nach Zentrifugation (5 min, 150 g) wurde der Überstand bis auf 1 ml abgesaugt und das Pellet im Restüberstand komplett resuspendiert. Vorsichtig wurde zunächst 1 ml Fixativ-Lösung hinzugefügt und nachdem die Suspension vollständig aber schonend durchwirbelt war, wurde die Probe mit 5 ml Fixativ aufgefüllt und erneut gemischt. Es wurden zwei Fixativwechsel durchgeführt. Dazu wurde die Probe jeweils für 5 min bei 150 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in frischer Fixativ-Lösung resuspendiert. Schließlich wurden Teile der Suspension auf einen mit Ethanol gereinigten, waagerecht gehaltenen Objektträger aufgetropft. Nachdem Newton'sche Ringe sichtbar waren, wurde der Objektträger zur besseren Spreitung der Metaphasen-Chromosomen in Wasserdampf gehalten. Die Präparate wurden an der Luft getrocknet und unter dem Mikroskop vorbegutachtet. Anschließend wurden die Objektträger für ca. 15 – 30 min in Giemsa-Farblösung eingetaucht, dann mit Wasser gespült und wiederum getrocknet. Die Präparate wurden in Epoxidharz eingebettet und mit Deckgläsern versiegelt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.

3.4 Immunfluoreszenz

Zur Darstellung von Antigenen auf Einzelzellebene wurden $0,5 \times 10^5$ Zellen pro *well* einer 12-*well*-Platte ausgesät. In jedem *well* war zuvor je ein runder Deckglas (12 mm Ø) platziert worden. Am folgenden Tag bzw. nach einer für den jeweiligen Versuchsansatz spezifischen Behandlung wurde das Nährmedium abgenommen, die Zellen zweimal in PBS gewaschen und für 10 min in 4 % Paraformaldehyd bei RT fixiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen in 0,1 % TritonX-100/PBS-Lösung für 30 min bei RT permeabilisiert. Alternativ erfolgte die Permeabilisierung in Methanol, der auf -20 °C vorgekühlt war, für 30 min auf Eis. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation in 20 % FCS/PBS-Lösung für 30 min bei RT geblockt. Es folgte die Inkubation (1 h bei RT) mit einem Antigen-spezifischen Antikörper, welcher nach Herstellerangaben in 1 % BSA/PBS-Lösung verdünnt war. Wenn der verwendete Antikörper nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, wurde das Präparat für 30 min mit einem sekundären Antikörper (1:1000 in 1 % BSA/PBS-Lösung) inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung der DNA mit 1 µM Hoechst 33342 für 10 min bei RT. Die Präparate wurden viermal für jeweils 10 min in 1 % BSA/PBS-Lösung gewaschen. Die Deckgläser wurden mittels *Vectashield* auf gereinigte Objektträger aufgebracht und im Dunklen bei 4 °C gelagert. Die Präparate wurden an einem inversen Fluoreszenzmikroskop des Typs *Axiovert 200M* (Zeiss) analysiert, welches mit 40- bzw. 63-fach Ölimmersionsobjektiven ausgestattet war. Bildaufnahmen und Auswertungen erfolgten mit einer *AxioCam MRm*-Kamera und *AxioVision*-Software (Zeiss).

3.5 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen wurden an einem analytischen Gerät des Typs *LSR II* (BD) durchgeführt, welches mit einem Argon-Ionenlaser (488 nm), einem Helium-Neon-Gaslaser (633 nm) und einem Helium-Cadmium-Feststofflaser (325 nm) ausgestattet war. Um die Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation zu bestimmen, wurde die DNA der einzelnen Zellen durch stöchiometrische Bindung des Farbstoffes DAPI angefärbt, eine Fluoreszenzmessung durchgeführt und die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten in Histogrammen aufsummiert. Dazu wurden die geernteten Zellen einmal in PBS gewaschen, in 500 µl DAPI-Färbelösung (4 µg/ml) resuspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Um neben dem DNA-Gehalt zusätzlich die Expression eines bestimmten Antigens zu erfassen, wurden die Zellen zunächst mit 2 % PFA für 10 min bei 37 °C fixiert und mit auf -20 °C vorgekühltem, 90%igem Methanol für 30 min auf Eis permeabilisiert. Anschließend wurden die Proben entweder bei -20 °C in Methanol bis zu einigen Wochen lang aufbewahrt, oder es wurde gleich mit der Färbung fortgefahren. Dazu wurden die Zellen sedimentiert, zweimal in PBS gewaschen, in 500 µl FSC/PBS-Lösung (5 %) resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungstellen zu sättigen. Es folgte eine Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper für 1 h bei RT, welcher nach Herstellerangaben in 50 µl FCS/PBS-Lösung verdünnt wurde. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper für 30 min im Dunklen inkubiert. Der sekundäre Antikörper war entweder mit *Alexa Fluor 488* oder *647* gekoppelt und wurde 1:1000 in 5 % FCS/PBS-Lösung verdünnt. Die Zellen wurden dann nochmals gewaschen und in mindestens 400 µl 4 µg/ml DAPI-Färbelösung für 30 min bei 4 °C inkubiert, bevor die Messung erfolgte. Die Messdaten wurden mit den Computerprogrammen *WinMDI* und *Cylchred* ausgewertet.

3.6 Charakterisierung von Nukleinsäuren

3.6.1 Präparation genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten erfolgte nach einer Aussalzungsmethode. Etwa 5×10^6 Zellen wurden in einem 50 ml-Reaktionsgefäß sedimentiert (150 g, 5 min, 4 °C) und zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,85 ml SE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,15 ml Proteinase-K-Lösung (1 µg/ml) und 0,025 ml 20 % SDS-Lösung wurde die Suspension bei 55 °C für mindestens 3 h inkubiert. Dann wurden 0,4 ml 6 M NaCl-Lösung hinzugegeben und gründlich mit Vortex-Gerät gemischt bis eine milchige Trübung einsetzte. Ausgefallenes Protein und Zellreste wurden durch Zentrifugieren sedimentiert (3500 g, 15 min, RT) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe des zweifachen Volumens an 100 % Ethanol wurde die DNA ausgefällt. Mit Hilfe eines Glashakens wurde der DNA-Faden herausgezogen, zum Waschen kurz in 70 % Ethanol eingetaucht und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA je nach geschätzter Menge in 0,05-0,3 ml TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.6.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Plasmidisolation in analytischem Maßstab wurde eine Übernacht-Kultur des ausgewählten Klons in 3 ml Antibiotika-haltigem LB-Flüssigmedium angesetzt und bei 37 °C geschüttelt. Plasmid-DNA wurde mit dem *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research) nach Angaben des Herstellers isoliert und schließlich mit 30 µl ddH_2O eluiert. Zur Isolierung von Plasmid-DNA in präparativem Maßstab wurde der *Plasmid Maxi Prep Kit* (Qiagen) verwendet. Dazu wurde eine Vorkultur in 3 ml LB-Medium angesetzt und wie beschrieben behandelt. 8 h später wurden 100 µl dieser Vorkultur in 100 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Isolierung des Plasmids erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in ddH_2O gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.6.3 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung wurden photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen und aus dem resultierenden Wert die Konzentration der Nukleinsäure in der Lösung automatisch errechnet. Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm

abgeschätzt, welches in der Regel zwischen 1,7 und 2,0 lag und indikativ für die reine DNA-Isolierung war.

3.6.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gel-Elektrophorese wurden, in Abhängigkeit von den Fragmentgrößen, 1 – 2 % Agarosegele verwendet. Für die Auftrennung sehr kleiner DNA-Fragmente (< 200 bp) wurden 3 % Gele aus *Phor*-Agarose hergestellt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1x TBE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid (10 ng/ml Endkonz.) versetzt. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde die Agarose-Lösung in Gelschlitten mit Taschenformern gegossen und die Gelierung abgewartet. Zur Elektrophorese wurden die Gelschlitten in Laufkammern mit 1x TBE-Lösung als Laufpuffer gesetzt. 5 µl einer jeden DNA-Probe wurden mit 1,5 µl 6x DNA-Probenpuffer versehen und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 Volt. Als Größenmarker dienten DNA-Standards (NEBiolabs, Fermentas). Die DNA-Banden wurden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert.

3.6.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes nach der Agarosegel-Elektrophorese wurde die entsprechende Bande aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA unter Verwendung von *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research) gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt.

3.6.6 Polymerase-Kettenreaktion, PCR

Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsmischungen und -Reaktionsbedingungen variierten je nach Typ der verwendeten DNA-Polymerase und wurden an die Empfehlungen des jeweiligen Herstellers angepasst. Die Annealing-Temperatur der Primer wurde nach der *nearest-neighbor*-Methode [76] mit dem Computerprogramm *Multiple primer analyzer* ermittelt.

3.6.7 Quantitative PCR

Quantitative PCR wurde mit der vorgefertigten Reaktionsmixtur *PerfeCTa™ SYBR® Green SuperMix* (Quanta) im *iQ Real-Time PCR System* (BioRad) durchgeführt. Dazu wurde jeweils 1 µl cDNA als Template und 1 µl von jedem Primer (0,25 µM Endkonz.)

verwendet. Die Reaktionen wurden in Doppelansätzen über 48 Zyklen hinweg nach dem folgenden Schema ausgeführt: 15 sec bei 95 °C, 30 sec bei 60 °C sowie 30 sec bei 72 °C. Die Detektion erfolgte während des letzten Schritts. Am Anschluss daran wurden die Schmelzprofile der Amplifikate ermittelt. Dazu wurden die Proben für 1 min bei 99 °C denaturiert und für 1 min bei 55 °C renaturiert. Dann wurde die Temperatur im 10-sec-Takt um jeweils 0,5 °C erhöht bis 95 °C erreicht waren. Amplifikationen mit *UBC*-, *B2M*-, *HPRT*- und *GAPDH*-spezifischen Primern wurden als endogene Kontrolle verwendet. Verdünnungsreihen von linearisierten Plasmiden, die einzelne *MCPH1*-Varianten enthielten, wurden zur Erstellung von Eichgeraden verwendet, um damit die Kopienzahl von *MCPH1*-Varianten in den untersuchten Proben zu ermitteln. Die *MCPH1*-spezifischen Primersequenzen sind im Anhang angegeben.

3.6.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde mit Hilfe der Didesoxymethode durchgeführt. Ein Sequenzier-Ansatz von 10 µl bestand aus dem DNA-Template (PCR-Produkte 10-100 ng, Plasmide 200-500 ng), 1 µl Primer (1 µM Endkonz.), 2 µl Reaktions-Mix (*BigDye Terminator v1.1*) und 1 µl Sequenzier-Puffer. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Programm: 3 min bei 96 °C, dann 25 Zyklen bestehend aus drei Schritten: 15 sec bei 96 °C, 90 sec bei 60 °C sowie 90 sec bei 50 °C und anschließend 3 min bei 60 °C. Die Reaktionsprodukte wurden durch Ethanolfällung gereinigt. Dazu wurden zum Sequenzieransatz 100 µl 0,3 M NaOAc und 250 µl 100 % Ethanol gegeben. Nach Zentrifugation bei 20 000 g für 15 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in einem Vakuumtrockner eingedampft und in 20 µl *Hi-Di™ Formamide* aufgenommen. Schließlich wurden die Proben in einem Sequenziergerät des Typs *ABI PRISM 310 Genetic Analyser* (ABI) aufgetrennt und vermessen.

3.6.9 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden ca. 5×10^6 suspendierte Zellen einmal in PBS gewaschen. Gesamt-RNA wurde mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die isolierte RNA wurde in 40 µl RNAse-freiem ddH_2O gelöst.

3.6.10 DNase I-Verdau

Um eine DNA-Kontaminationen der RNA zu entfernen, wurde im Anschluss an die RNA-Isolierung eine Behandlung mit dem Enzym DNase I durchgeführt. Dazu wurde der *Turbo DNA-free™ Kit* (Ambion) verwendet. Ein Reaktionsansatz bestand aus 10 µg RNA gelöst in 50 µl ddH_2O und 2 U des Enzyms. Sonstige Bestandteile und der Reaktionsablauf entsprachen den Angaben des Herstellers.

3.6.11 cDNA-Synthese

Die Synthese des zur RNA komplementären DNA-Stranges (cDNA) erfolgte mit dem *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) nach dem Protokoll des Herstellers. Pro Ansatz wurde 1 µg an Gesamt-RNA mit polydT-Primer für 1 h bei 50 °C transkribiert. Standardmäßig wurde ein Aliquot von 1 – 2 µl des Reaktionsprodukts für die darauf folgende PCR eingesetzt. Wenn die cDNA für die quantitative PCR verwendet werden sollte, wurde das Reaktionsprodukt mit Wasser auf 100 µl Volumen verdünnt. Davon wurden jeweils 5 µl pro PCR-Reaktion eingesetzt.

3.6.12 RACE

Die Charakterisierung der cDNA-Enden erfolgte mit der RACE-Methode (*rapid amplification of cDNA ends*). Dazu wurde das Kit-System *FirstChoice® RLM-RACE Kit* (Ambion) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die RACE-Produkte wurden mittels des *StrataClone™ Blunt PCR Cloning Kits* (Stratagene) in pSC-B-amp/kan-Vektor (Stratagene) einkloniert und in *StrataClone™ SoloPack Competent Cells* (Stratagene) transformiert. Es folgte eine Plasmid-Präparation aus positiven Klonen (*blue-white-screening*) und die Sequenzierung der Inserts mit den Vektor-spezifischen T3for- bzw. T7rev-Primern. Die Sequenzen wurden über BLAST identifiziert. Die Sequenzinformation der verwendeten RACE- und der Sequenzier-Primer ist im Anhang aufgeführt.

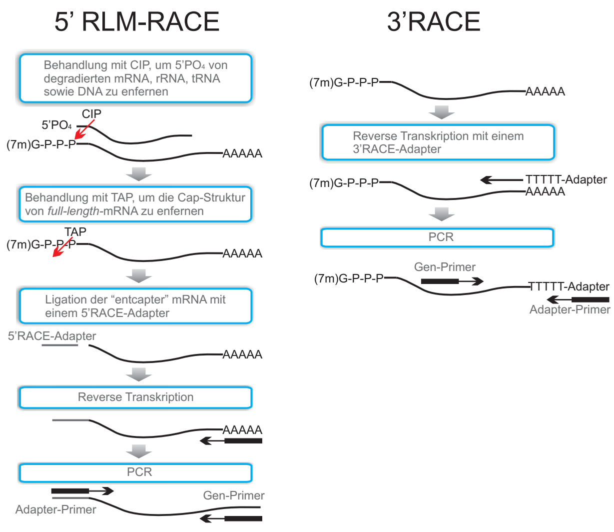


Abbildung 3.1 *Das Prinzip der RACE-Methode. Links: 5'RLM-RACE; rechts: 3'RACE. Die Grafik ist dem Handbuch des FirstChoice RLM-RACE Kits (Ambion) entnommen und modifiziert dargestellt.*

3.6.13 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Erzeugung von MCPH1-Varianten mit deletierten NLS-Sequenzen wurde *In-vitro*-Mutagenese mittels *Overlap-extension*-Methode durchgeführt [77]. In Vektor klonierte kodierende Sequenzen von *Full-length-MCPH1* (*MCPH1-FL*) oder *MCPH1Δe8* dienten als Ausgangssequenzen. Zur Herstellung von Konstrukten mit intaktem NLS2 wurde *MCPH1-FL* verwendet, während für Konstrukte mit fehlenden NLS2 *MCPH1Δe8* als Template diente. Um NLS1 bzw. NLS3 zu deletieren, wurden die entsprechenden wt-Sequenzen AAAAAAAAACGTAAA durch CGATCG bzw. GGAAAGAAGAAA durch ACCGGT ersetzt. Die neuen Sequenzen stellten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Pvu*I bzw. *Age*I dar. Die Einführung dieser Schnittstellen sollte bei der späteren Suche nach korrekten Klonen helfen. Im ersten Schritt des Verfahrens wurden in zwei separaten PCRs zwei Fragmente des Gens amplifiziert. Jede Reaktion benutzte einen flankierenden Primer, welcher an einem Ende der Zielsequenz band und einen internen Primer, der spezifisch für die Stelle mit der gewünschten Mutation war. Nach der PCR-Reaktion wurde das Ausgangstemplate durch Behandlung mit der Endonuklease *Dpn*I entfernt, da diese nur die methylierte DNA des Plasmids hydrolysiert. Weil die beiden in der ersten PCR verwendeten internen Primer überlappende Sequenzen besaßen, könnten die zwei generierten Fragmente in einer nachfolgenden PCR-Reaktion fusioniert werden. Die Vorgehensweise ist in Abb. 3.2 grafisch dargestellt. Die resultierten Sequenzen wurden mit *Bsr*GI geschnitten und in den Vektor pEGFP-N3 einkloniert, wodurch eine *in frame*-Fusion mit der *EGFP*-Sequenz entstand.

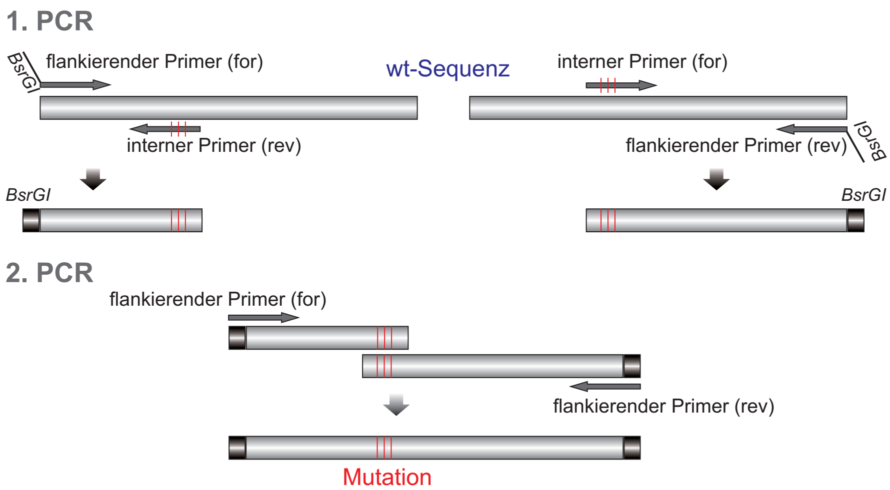


Abbildung 3.2 *Schematische Darstellung des Prinzips der Mutagenese nach der Overlap-extension-Methode. Pfeile symbolisieren flankierende Primer mit BsrG I-spezifischen Sequenzüberhängen bzw. interne Primer mit den gewünschten Mutationen, die durch rote Striche verdeutlicht sind. Die zwei in der 1. PCR-Reaktionen entstandenen Fragmente mit den eingefügten Mutationen wurden in der 2. PCR-Reaktion über die überlappende Region und die flankierenden Primer wieder fusioniert.*

3.6.14 Molekulare Klonierung

3.6.14.1 Restriktionsverdau

Für die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA-Fragmenten wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Die Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern und entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers verwendet. Beim Einsatz von mehreren Restriktionsenzymen gleichzeitig wurde ein passender Puffer nach den Tabellen der Hersteller ausgewählt. Waren die Enzyme mit keinem gemeinsamen Puffer kompatibel, so wurde der Restriktionsverdau sequentiell durchgeführt. Der Erfolg eines jeden Restriktionsverdaus wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Falls das betreffende DNA-Fragment für eine Ligation verwendet werden sollte, wurde dieses mit Hilfe von *DNA Clean & Concentrator™ Kit* (Zymo Research) entsalzt und konzentriert.

3.6.14.2 Dephosphorylierung

Um eine unerwünschte Religation eines linearisierten Plasmids in einem Ligationsansatz zu verhindern, wurden die 5‘-Termini durch Alkalische Phosphatase dephosphoryliert, da für eine Ligation die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung unentbehrlich ist. Die Reaktion erfolgte gleichzeitig mit dem Restriktionsverdau. Dazu wurde 1 U des *Calf-Intestinal-Phosphatase*-Enzyms pro 3 – 4 µg DNA in den Reaktionsansatz gegeben und für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Auf die empfohlene Hitzeinaktivierung des Enzyms konnte verzichtet werden, da die linearisierte Plasmid-DNA wie bereits beschrieben gereinigt wurde.

3.6.14.3 Ligation

Für einen Standardligationsansatz von 20 µl wurde zum linearisierten Vektor (50 ng) das DNA-Fragment in 3-fachem molaren Überschuss zugegeben. Nach Zusatz von 2 µl 10x Ligasepuffers und 1 µl *T4*-DNA-Ligase (400 U) wurde der Reaktionsansatz 1 h bei RT bzw. bei 16 °C über Nacht inkubiert.

3.6.14.4 Transformation

Chemokompetente Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut. Ein Aliquot von 5 µl des Ligationsansatzes wurde zu der Zellsuspension gegeben. Die Probe wurde mit der Pipettenspitze vorsichtig gemischt und auf dem Eis 20 – 30 min lang inkubiert. Durch einen Hitzeschock von 30 sec bei 42 °C erfolgte die Transformation. Nachdem die Zellen auf

dem Eis für 5 min abgekühlt waren, wurden 250 µl SOC-Medium zu der Suspension hinzugefügt und die Probe für 1 h im Inkubator bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Kultur wurden dann 200 µl mit einem Trigalski-Spatel auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen, die ein Antibiotikum zur Selektion transformierter Bakterien enthielt. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Wenn ein *Blue-white-Screening* erfolgen sollte, wurden mindestens 30 min vor dem Ausplattieren der Bakterien 40 µl 2 % X-Gal-Lösung auf der Agarplatte verteilt.

3.6.14.5 Selektion und Screening

Die Selektion für positive Klone, d.h. Kolonien mit Bakterien, welche das rekombinante Plasmid aufgenommen hatten, erfolgte je nach Plasmidart durch die Antibiotika Ampicillin oder Kanamycin. Mit Hilfe einer Kolonie-PCR wurde nach Klonen gesucht, die das rekombinante Plasmid enthielten. Dazu wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und auf eine frische Platte an eine nummerierte Position überimpft. Die Spitze wurde in ein Gefäß mit PCR-Reaktionsmischung eingetaucht. Als Primer wurde je ein Vektor- und ein Insert-spezifisches Oligonukleotid verwendet. Durch gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte konnte festgestellt werden, welche Klone das Plasmid mit dem Insert in der gewünschten Orientierung enthielten. Anschließend wurde Plasmid-DNA aus einer Flüssigkeits-Kultur eines positiven Klons isoliert und daran das Ergebnis der Kolonie-PCR mittels Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung überprüft.

3.7 Proteinanalytische Methoden

3.7.1 Proteinextraktion

Für die Gesamtproteinextraktion wurden ca. 5×10^6 Zellen zweimal in gekühltem PBS gewaschen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. in einer vorgekühlten (4 °C) Zentrifuge durchgeführt. Die sedimentierten Zellen wurden in 50 µl Extraktionslösung (s. Abschnitt 2.8) vollständig resuspendiert und für 45 min auf Eis lysiert. Nach anschließender Abzentrifugation (20 000 g, 10 min) der Zellrückstände wurde der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Die Proteinextrakte wurden kurzfristig bei -20 °C, langfristig bei -80 °C gelagert. Für die Extraktion von cytoplasmatischen bzw. Zellkern-spezifischen Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des *Nuclear/Cytosol Extraction Kits* (BioVision) nach dem Protokoll des Herstellers fraktioniert.

3.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die quantitative Bestimmung des Gesamtproteingehalts in Zellextrakten wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt. Dazu wurden 2 µl des Proteinextrakts mit 1000 µl Bradford-Reagenz gemischt und die Extinktion der Protein-Bradfordlösung bei 595 nm bestimmt. Anhand einer mit BSA-Standards erstellten Eichkurve wurde die Gesamtprotein-Konzentration ermittelt.

3.7.3 SDS-Gelelektrophorese

Proteinextrakte (50 – 70 µg) wurden mit vierfach konzentriertem *NuPAGE® LDS Sample Buffer* (Invitrogen) und 2,5 M DTT versetzt und die Proteine für 10 min bei 70 °C denaturiert. Nach Abkühlung wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen. Für die Elektrophorese wurden vorgefertigte Minigele (*NuPAGE®Novex® Tris-Acetate* 7 % bzw. *Bis-Tris* 4-12 %) und die Elektrophoresekammer *XCell SureLock™ Mini-Cell* von Invitrogen verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V in *NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer* im Falle von TA-Gelen bzw. bei 200 V in *NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer* bei BT-Gelen. Um den sogenannten *Smily*-Effekt[1] zu vermeiden, wurde die Elektrophoresekammer in Eiswasser platziert. Als Molekulargewichtsmarker diente ein Gemisch gefärbter Proteinstandards bekannter Molekulargewichtsgrößen (s. Abschnitt 2.6).

[1]Ungleichmäßiges Laufverhalten der Banden.

3.7.4 Proteintransfer

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde entweder mit Hilfe des *XCell II™ Blot Module*-Systems (Invitrogen) oder nach dem Tankblot-Verfahren in einem vertikalen Puffertank *BlueBlot Wet/100* (Serva) durchgeführt. Um die PVDF-Membran zu aktivieren, wurde diese kurz in 100 % Methanol eingetaucht und danach in Transferpuffer überführt. Der Transfer erfolgte bei 30 V (XCell II™) bzw. bei 75 V (Tankblot) für mindestens 1 h in mit 5 % Methanol versetztem *NuPAGE® Transfer Buffer* (Invitrogen).

3.7.5 Immunologische Detektion

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT mit Blockierungslösung (5 % Magermilchpulver in PBST) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper in der Regel für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit PBST für jeweils 5 min folgte eine Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Im Anschluss daran wurden die Membranen mindestens dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurden die ECL-Detektionssysteme *ChemiGlow™ West* (Alpha Innotech) bzw. *Limigen™ PS-3* (Amersham Biosciences) eingesetzt. Emittierte Chemilumineszenz wurde durch die Exposition der Membran gegenüber einem Autoradiografiefilm nachgewiesen. Die Expositionszeiten variierten je nach Typ des eingesetzten Primärantikörpers bzw. je nach Abundanz des untersuchten Antigens zwischen 1 sec und 1 h. Bei einem Teil der Untersuchungen wurde ein Geldokumentationssystem *FluorChem® HD2* (Alpha Innotech) zur Signalmessung verwendet. Die Dokumentation und quantitative Auswertung der Signalstärke erfolgten mit Hilfe des Programms *AlphaEaseFC* (Alpha Innotech).

3.7.6 "Strippen" von PVDF-Membranen

Um eine Membran nach einer Immunodetektion für eine weitere Analyse mit einem anderen Antikörper verwenden zu können, wurde diese in *Restore™ Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific) für 15 min bei RT gewaschen, um die gebundenen Antikörper zu entfernen. In Fällen, in denen dieses Reagenz ineffizient war, wurde die Membran in selbst hergestelltem Stripping-Puffer (s. Abschnitt 2.8) bei 65 °C für 30 min gewaschen. Nach einem weiteren Waschschritt in PBST wurde die Membran erneut mit Blockierungslösung abgesättigt. Dann wurde weiter verfahren wie oben beschrieben. Nach Abschluss

aller Untersuchungen wurden die Membranen in PBST eingeschweißt und bei 4 °C gelagert. Sie waren nach Ablauf einiger Jahre noch immer verwendbar.

3.8 Dual-Luciferase Reporter Assay

Die Untersuchung von potentiellen Promotorregionen des *MCPH1*-Gens fand mit Hilfe des *Dual-Luciferase® Assay Systems* (Promega) statt. Dabei handelt es sich um eine Reportergen-Methode. Relevante *MCPH1*-Sequenzabschnitte wurden in den Vektor pGL3-Basic (Promega) über die Schnittstellen *Xho*I und *Hin*dIII aufwärts der *luc*$^+$-cDNA einkloniert, die für die Firefly-Luciferase der Leuchtkäferart *Photinus pyralis* kodiert. Je nach Promotoraktivitätspotenzial der untersuchten Sequenzen erfolgte eine stärkere bzw. schwächere Expression des Reportergens. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten der Vektor pGL3-SV40, in dem das *luc*$^+$-Gen unter Kontrolle des SV40-Promotors (*Simian virus 40*) stand und der pGL3-basic-Vektor, welcher keinen Promotor enthielt. Um Unterschiede zu eliminieren, die evtl. aus einer verschiedenen Transfektionseffizienz einzelner Ansätze resultieren würden, wurden die Reportergenkonstrukte mit dem Kontrollvektor pRL-SV40 kotransfiziert, welcher die Renilla-Luciferase aus der Seefedernart *Renilla reniformis* exprimiert. Der Nachweis der Expressionsstärke beider Reportergene erfolgte über die Aktivität der exprimierten Enzyme. Die Firefly-Luciferase katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin, die Renilla-Luciferase dagegen die Umsetzung von Coelenterazin zu Coelenteramid. Beide Reaktionen werden von einer Emission von Licht begleitet. Diese Lumineszenzen der beiden Reaktionen wurden sequentiell von einem Luminometer des Typs *Mithras LB940* (Berthold Technologies) detektiert. Alle Transfektionen wurden in Tripletts durchgeführt. 48 h nach der Transfektion (s. Abschnitt 3.2.1) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 250 µl *Passive Lysis Buffer* für 15 min bei RT auf einem Orbitalschüttler lysiert. 20 µl des jeweiligen Lysats wurden in eine 96-*well*-Platte überführt, welche dann im Luminometer platziert wurde. Die Zugabe der spezifischen Substrate, die in den Reagenzien *LAR II* bzw. *Stop & Glow* enthalten sind, sowie die Messungen der Lichtintensitäten erfolgten automatisch am Gerät. Der Quotient der relativen Lichteinheiten (RLU) der Firefly-Luciferase geteilt durch die RLU der Renilla-Luciferase wurde als Wert der relativen Stärke der untersuchten Promotor-Sequenz bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 MCPH1-Isoformen

4.1.1 *MCPH1*-Transkriptvarianten in Datenbanken

Die Datenbanken GenBank von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) [78] und ASTD (*Alternative Splicing and Transcript Diversity*) [79] wurden auf eingetragene *MCPH1*-Varianten hin untersucht, um die Möglichkeit der Existenz mehrerer Transkript-Isoformen des *MCPH1*-Gens zu prüfen. In beiden Datenbanken ist *MCPH1*-Transkript mit 14 Exons registriert (GenBank: NM_024596; ASTD: ENST00000344683), welches im Folgenden als *Full-length-MCPH1* (*MCPH1-FL*) bezeichnet wird. In der ASTD-Datenbank sind neben *MCPH1-FL* zwei alternative Transkript-Varianten eingetragen: eine mit fehlenden Exons 1 – 3 (TRAN00000035386) und eine zweite ohne die Exons 9 - 14 (TRAN00000035387). Nachfolgend werden diese Varianten als *MCPH1Δe1-3* bzw. -*Δe9-14* bezeichnet (Abb. 4.1). Die Sequenz von *MCPH1Δe1-3* ist ebenfalls in der GenBank unter der Zugangsnummer AK022909 eingetragen. Diese Variante wurde in einer Arbeit über negative Regulatoren der Telomerase-Untereinheit hTERT beschrieben [33], allerdings als reguläres und nicht als ein alternatives Transkript. In jener Studie wurde das entsprechende Protein als BRIT1 bezeichnet. Dieses, bis dahin nicht charakterisiertes theoretisches Polypeptid wurde später als Produkt des *MCPH1*-Gens identifiziert [38]. Die 2220 bp umfassende kodierende Region von *MCPH1Δe1-3* hat das gleiche Leseraster wie *MCPH1-FL* und kodiert für ein Protein mit der Größe von 740 Aminosäuren und 81 kDa. Wie in Abb. 4.1 dargestellt, fehlt dem vorhergesagten Translations-Produkt von *MCPH1Δe1-3* die N-terminale BRCT-Domäne, während die restlichen Strukturen mit MCPH1-FL übereinstimmen.

Das alternative Transkript *MCPH1Δe9-14*, das dem Klon BC030702.1 in der NCBI-Datenbank entspricht, resultiert aus einer Polyadenylierung in Intron 8. Dies führt zur Exonisierung von 1025 Nukleotiden aus dem 5'-Bereich dieses Introns. Diese Variante hat ebenfalls das gleiche Leseraster wie *MCPH1-FL*, jedoch wird seine CDS zwei Codons abwärts des ursprünglichen Exons 8 durch ein UGA-Stoppcodon beendet, woraus sich

eine zum *MCPH1-FL* alternative 3'UTR ergibt (Abb. 4.1). Das resultierende Protein hat eine Größe von 610 Aminosäuren und ca. 70 kDa. Ihm fehlen die beiden C-terminalen BRCT-Domänen.

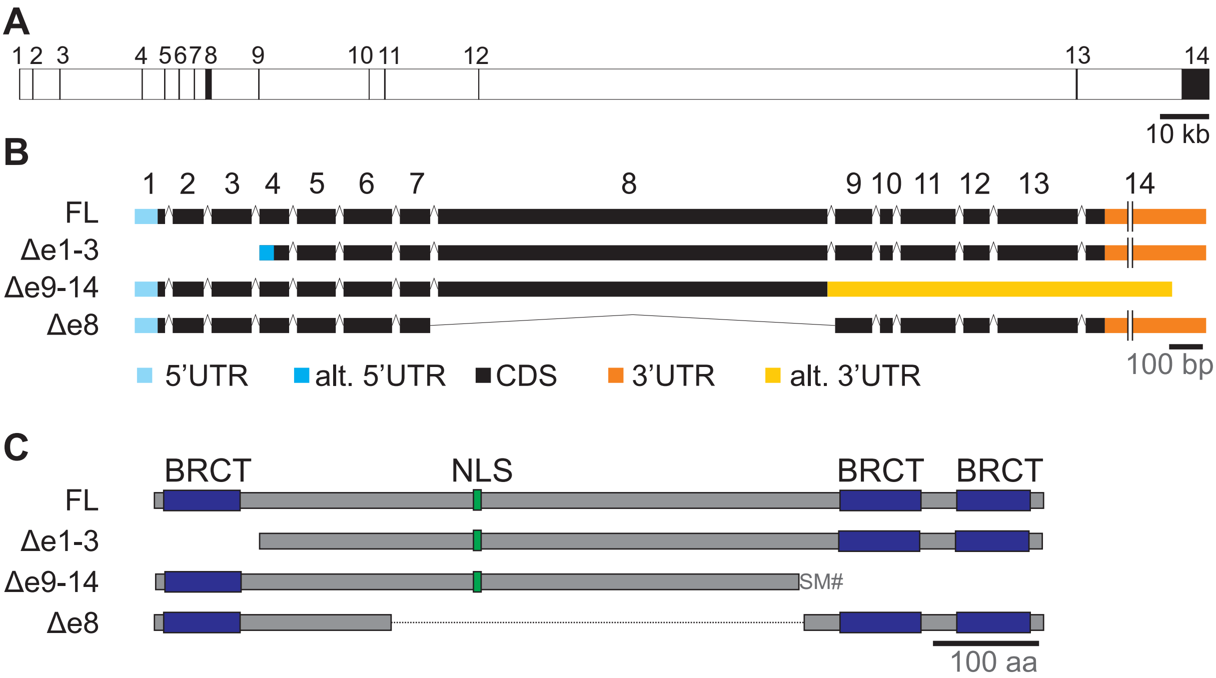


Abbildung 4.1 *Übersicht über MCPH1-Varianten.* ***A****. Exon-/Intron-Organisation des MCPH1-Gens. Die 14 Exons des 241 906 bp umfassenden MCPH1-Gens sind durch gefüllte Balken, die Introns durch offene Balken maßstabsgetreu dargestellt.* ***B****. Exon-Zusammensetzung des Full-length-MCPH1-Transkripts (FL) sowie der Varianten Δe1-3, Δe9-14 und Δe8. Die Exons sind als nummerierte äquivalente Rechtecke dargestellt.* ***C****. Von den Transkriptsequenzen abgeleitete Translationsprodukte. Die blauen Rechtecke zeigen die Positionen von BRCT-Domänen, während das grüne Rechteck die Stelle des kanonischen NLS-Motivs kennzeichnet. Die beiden zusätzlichen Aminosäuren (SM) bei der MCPH1-Isoform Δe9-14 entstehen durch Exonisierung von Introns 8.*

4.1.2 MCPH1Δe1-3

Da *MCPH1Δe1-3* die ersten 3 Exons fehlen, wäre eine Möglichkeit, seine Existenz zu erklären, die Verwendung einer alternativen Transkriptionsstartstelle (TSS) in Exon 4. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde eine 5'RLM-RACE (*RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends*) mit RNA aus HeLa- und HEK293-Zellen durchgeführt. Diese Methode erlaubt die cDNA-Amplifikation nur aus vollständigen, die 5'-Cap-Struktur tragenden RNA-Molekülen und damit die Identifizierung aller authentischen 5'-Enden der Transkripte eines bestimmten Gens [80]. Das Prinzip der 5'RLM-RACE ist in Abb. 3.1 skizziert. Um die 5'-Termini der *MCPH1-FL*- und *MCPH1Δe9-14*-Transkripte zu identifizieren, wurden rev-Primer verwendet, die für Exon 10 bzw. für Intron 8 spezifisch waren

und den Einschluss beider Variante ermöglichten (Abb. 4.2A). Nach Klonierung und Sequenzierung der 5'RACE-Produkte konnten 12 Klone mit *MCPH1*-Sequenzen identifiziert werden. In beiden untersuchten Zellarten ergaben sich keinerlei Hinweise auf die Expression der Transkript-Variante *Δe1-3*. Die klonierten Sequenzen hatten zwar unterschiedliche Startstellen, waren aber alle in Exon 1 positioniert (Abb. 4.2B, C), so dass ein Cluster von TSS in diesem Exon resultiert, welcher bis 67 bp aufwärts des regulären AUG-Startcodons reicht. Dieser Befund steht im Einklang mit den Positionen der *MCPH1*-TSS, die in der ASTD-Datenbank annotiert sind. Die dort angegebenen TSS befinden sich ebenfalls ausschließlich in Exon 1. In Abb. 4.2C wird die Überlappung der beiden Cluster nochmals grafisch veranschaulicht. Zudem wurde in eigenen Vorversuchen gezeigt, dass *In-vitro*-Expression von MCPH1-FL in einem eukaryontischen zellfreien System in einem einzigen Translationsprodukt resultierte, so dass davon auszugehen ist, dass keine AUG-Codons von *MCPH1* ausser demjenigen in Exon 1 als alternative Translationsstartcodons verwendet werden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass *MCPH1Δe1-3* nicht physiologisch exprimiert wird, zumindest nicht in den Zelltypen, die untersucht wurden. Zusätzlich wurde durch dieses Experiment verifiziert, dass *MCPH1-FL* und *MCPH1Δe9-14* gleiche 5'-Termini aufweisen.

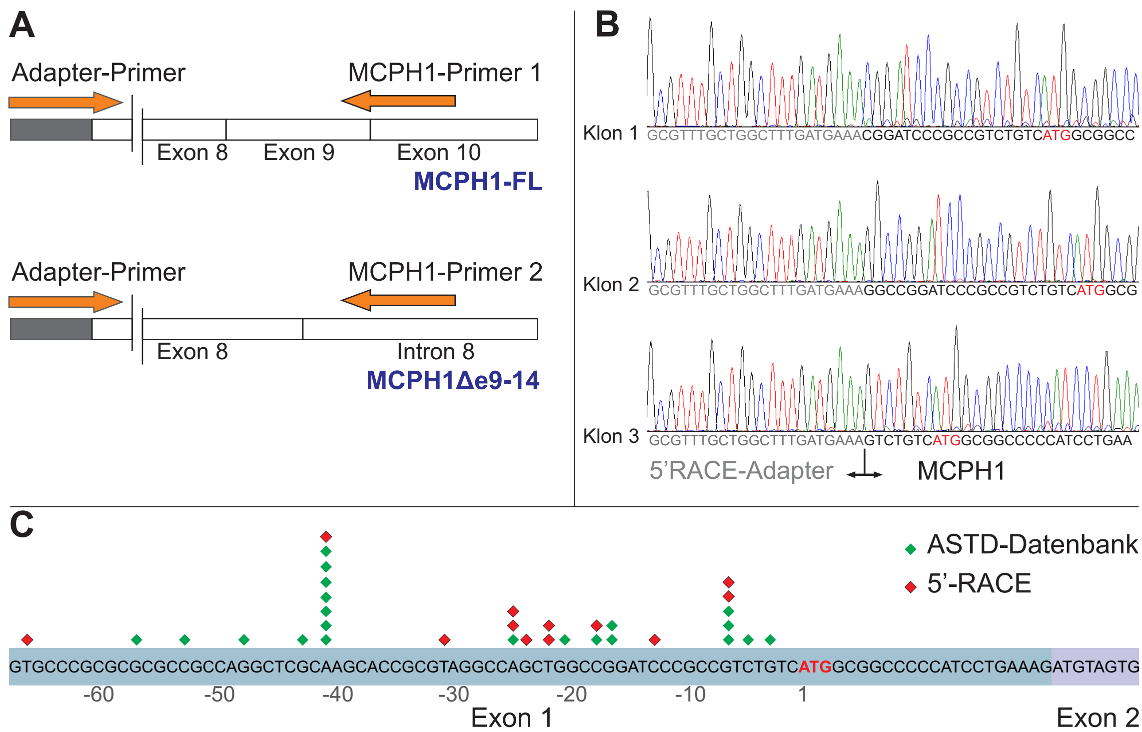


Abbildung 4.2 *5'RLM-RACE.* ***A****. Positionen der verwendeten Primer.* ***B****. Elektropherogramme dreier exemplarisch ausgewählter 5'RACE-Produkte. Die Sequenz des 5'RACE-Adapters ist hellgrau, MCPH1-Sequenzen sind schwarz dargestellt. Das ATG-Startcodon ist rot hervorgehoben.* ***C****. Positionen der Transkriptionsstartstellen (TSS). Die durch 5'RACE nachgewiesenen TSS sind durch rote, aus der ASTD-Datenbank entnommene TSS-Positionen durch grüne Rauten gekennzeichnet.*

4.1.3 MCPH1Δe9-14

Um die 3'UTR von *MCPH1Δe9-14* zu charakterisieren, wurde ein 3'RACE-Experiment durchgeführt (Abb. 3.1). Das Primerpaar für die anschließende PCR-Reaktion bestand aus einem 3'RACE-Adapter-spezifischen rev-Primer sowie einem for-Primer, der komplementär zum 5'-Ende von Intron 8 war. Die Auftrennung der 3'RACE-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese resultierte in multiplen Banden unterschiedlicher Laufgeschwindigkeiten (Abb. 4.3A). Die 3'RACE-Produkte wurden *blunt-ended* in den Vektor pSC-B-amp/kan einkloniert und damit *E. coli* transformiert. Bei der Sequenzierung von 36 Klonen wurden 15 mit *MCPH1*-spezifischen Sequenzen identifiziert, die wiederum Hinweise auf 6 unterschiedliche Polyadenylierungsstellen (PolyA-Stellen) in Intron 8 gaben. Sie wurden in 5' nach 3' Richtung ausgehend von der Exon/Intron-8-Grenze mit I bis VI durchnummeriert (Abb. 4.3B, C). Die PolyA-Stelle VI stimmte mit derjenigen überein,

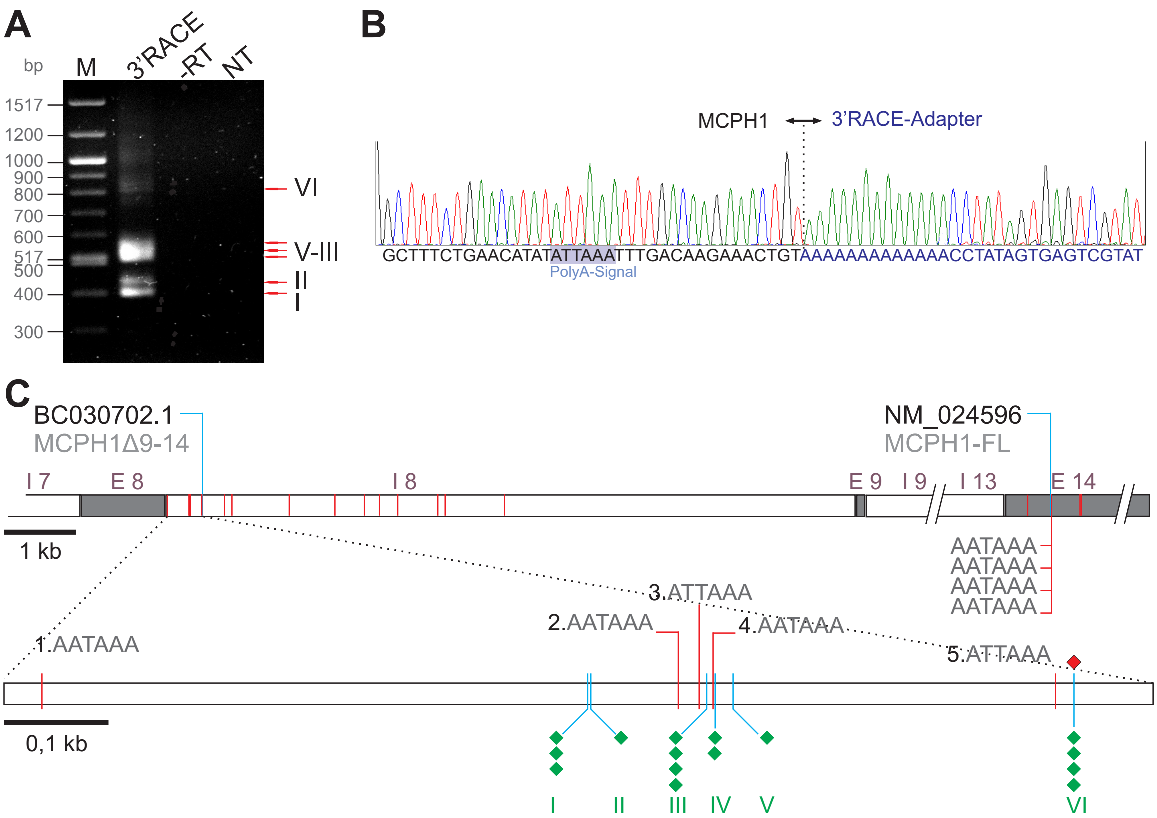


Abbildung 4.3 *Untersuchung der 3'UTRs von MCPH1Δe9-14.* ***A****. Gelelektrophoretische Auftrennung der 3'RACE-Produkte; -RT: Kontrollansatz der cDNA-Synthese ohne Reverse-Transkriptase; NT: non-Template-Kontrolle. Die roten Pfeile deuten auf Banden, die PolyA-Stellen im C entsprechen.* ***B****. Sequenz-Elektropherogramm eines der 3'RACE-Produkte von MCPH1Δe9-14-Transkripten.* ***C****. Mittels polyadq prognostizierten PolyA-Signale (rote Striche) in Intron 8 und durch 3'-RACE ermittelte PolyA-Stellen (blaue Striche). Jede grüne Raute entspricht einem 3'RACE-Produkt, die rote Raute der PolyA-Stelle in der Referenzsequenz BC030702.1. Durch offene Balken sind Intron-, durch gefüllte Balken Exonbereiche maßstabsgetreu dargestellt.*

die in GenBank für Klon BC030702.1 angegeben ist. Die restlichen 5 PolyA-Stellen lagen weiter upstream, wodurch kürzere 3'UTRs entstehen. Die Existenz der längsten Variante (unter Benutzung von PolyA-Stelle VI) und ihre Sequenz wurden durch Amplifikation über RT-PCR mit Primern bestätigt, welche die gesamte ORF dieser Variante einschließlich der 3'UTR flankierten (Abb. 4.4).

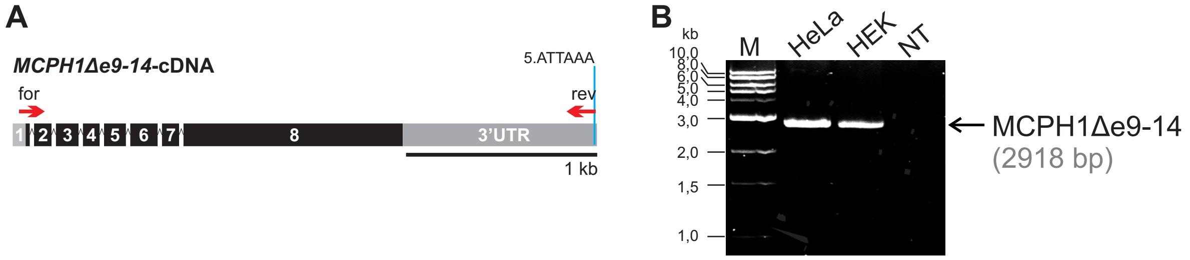


Abbildung 4.4 *Amplifikation der längsten MCPH1Δe9-14-Variante mittels RT-PCR von RNA aus HeLa- und HEK293-Zellen.* ***A****. Die acht Exons des Δe9-14-Transkripts sind durch äquivalente Balken dargestellt; die kodierende Region ist schwarz markiert. Die roten Pfeile zeigen die Positionen der Amplifikationsprimer.* ***B****. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. NT: non-Template-Kontrolle.*

Die Entstehung von *MCPH1Δe9-14* lässt sich durch das Vorhandensein mehrerer PolyA-Signale in Intron 8 erklären. Die Untersuchung der Sequenz von Intron 8 mit dem Programm *polyadq* [81] zeigte solche Signale an 15 Positionen (Abb. 4.3C). Wie man aus dieser Abbildung ersehen kann, folgen viele der durch 3'RACE nachgewiesenen PolyA-Stellen (das sind III – V) einem Cluster aus drei PolyA-Signalen (2. – 4. in Abb. 4.3C). Die distale PolyA-Stelle VI liegt ebenfalls unmittelbar hinter einem PolyA-Signal (5. in Abb. 4.3C). Es ist nachgewiesen, dass außer den PolyA-Signalsequenzen selbst zusätzlich eine Bindung von mehreren *cis*-aktiven Faktoren in einer Region von -125 und +125 Nukleotiden um die PolyA-Stelle herum für die Erkennung dieser Stelle von Bedeutung ist [82]. Die Datenbank für die PolyA-Stellen in Vertebratengenen *polyA_DB.2* [83] enthält neben den Positionen von PolyA-Signalen auch Informationen über diese *cis*-aktiven Faktoren. Tatsächlich werden um das 5. PolyA-Signal (5.ATTAAA in Abb. 4.3D) 34 Bindungsstellen für diese Faktoren vorhergesagt, die als "stark" bis "sehr stark" klassifiziert werden. Für das erste PolyA-Signal (1.AATAAA in Abb. 4.3D) bzw. für den Cluster aus den Signalen 2., 3. und 4. in Abb. 4.3D dagegen werden um die Hälfte weniger Bindungsstellen für *cis*-aktive Faktoren postuliert. Offensichtlich existieren mehrere *MCPH1Δe9-14*-Varianten, mit verschieden langen 3'UTR-Sequenzen resultierend aus multiplen PolyA-Signalen unterschiedlicher Stärke. Da jede einzelne dieser Sequenzen ein eher schwaches Polyadenylierungspotenzial besitzt (laut *polyadq*), wird vermutlich keine der *MCPH1Δe9-14*-Varianten prominent exprimiert. Nichtsdestotrotz wird eine mit *MCPH1-FL* vergleichbare Expression von *MCPH1Δe9-14* in der Summe seiner unterschiedlich langen Varianten erreicht, wie es im Abschnitt 4.1.7 gezeigt wird.

4.1.4 MCPH1Δe8

Während der Amplifikation der kodierenden Region von *MCPH1* aus cDNA von HeLa-Zellen wurde eine neue Spleißvariante entdeckt. In diesem Ansatz war der for-Primer komplementär zum 5'-Ende (Exon 1) und der rev-Primer komplementär zum 3'-Ende (Exon 14) der kodierenden Region von *MCPH1* (GenBank: NM_024596). Agarosegel-elektrophorese der PCR-Produkte zeigte zwei diskrete Banden, deren Mobilität 2500 bp bzw. 1300 bp entsprach (Abb. 4.5A). Eine Kontroll-PCR mit den gleichen Primern und einem Plasmid mit einkloniertem *MCPH1-FL* (S11MCPH1IN) als Template resultierte dagegen ausschließlich in einem 2500bp-Produkt, während im Ansatz ohne Template kein Produkt detektierbar war. Um die Natur des zusätzlichen PCR-Produktes zu untersuchen, wurden die 2500-bp- und die 1300-bp-Bande aus Gelen ausgeschnitten, die DNA daraus eluiert und einer Sequenzierung mit *MCPH1*-spezifischen Primern unterzogen. Diese Sequenzierung zeigte, dass die 2500-bp-Bande *MCPH1-FL* entsprach, während die 1300-bp-Bande durch das Fehlen der Sequenz des gesamten Exons 8 gekennzeichnet war (*MCPH1Δe8*, Abb. 4.5B). Die genaue Länge der kodierenden Sequenz der *Δe8*-Variante umfasste 1353 bp. Sie wies dasselbe Leseraster auf wie *MCPH1-FL*. Von der cDNA-Sequenz ließ sich ableiten, dass die *Δe8*-Transkriptvariante für ein Protein mit 450 Aminosäuren und einer molekularen Masse von ungefähr 50 kDa kodieren würde. Dieses Polypeptid würde alle drei BRCT-Domänen enthalten, es würde ihm aber die kanonische NLS fehlen, da diese von Exon 8 kodiert wird (vgl. Abb. 4.1D).

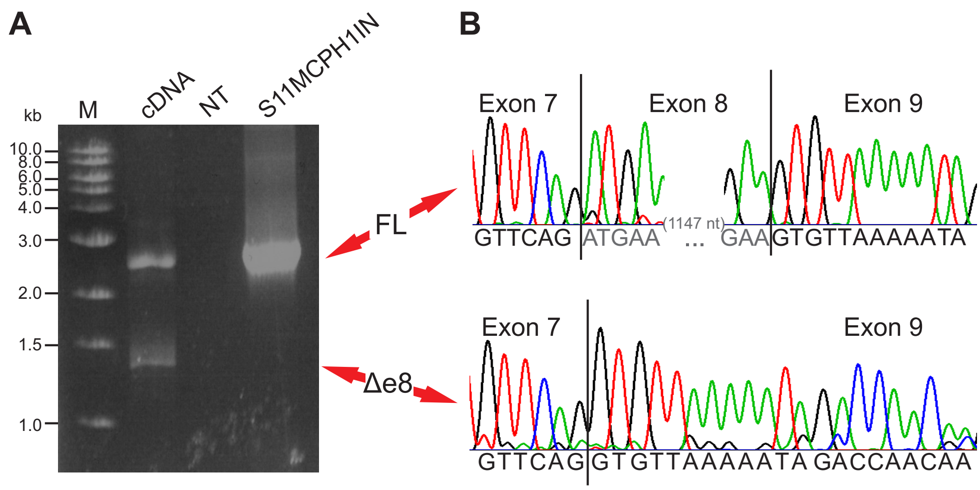


Abbildung 4.5 *Exon-8-Skipping in MCPH1-cDNA als Folge alternativen Spleißens von MCPH1-Prä-mRNA führt zu MCPH1Δe8. **A**. RT-PCR mit MCPH1-spezifischen Primern von RNA aus HeLa-Zellen resultiert in zwei Amplifikate unterschiedlicher Größe. PCR mit dem Plasmid S11MCPH1IN, das die kodierende Region von MCPH1-FL enthält, diente als positive Kontrolle und produzierte lediglich das größere Produkt; NT: non-Template-Kontrolle. **B**. Während das Elektropherogramm für das größere Fragment die authentische Sequenz von Exon 7, 8 und 9 zeigt (oben), findet sich beim kleineren Fragment ein direkter Übergang von Exon 7 nach 9.*

4.1.5 *In silico*-Analyse der 5'-Spleißdonorstellen im *MCPH1*-Gen

Zur Erklärung der Entstehung von *MCPH1Δe8* wurden die Spleißstellen der *MCPH1*-Introns untersucht. Das Herausschneiden von Introns aus einer Prä-mRNA erfordert die Bindung der Komponenten des Spleißapparates an spezifische Sequenzen an den Übergängen zwischen Exons und Introns. Dabei wird zwischen der 3'-Spleiß-Akzeptorstelle (3'SS) und der 5'-Spleiß-Donorstelle (5'SS) unterschieden, welche die 3'- bzw. 5'-Enden eines Introns flankieren und einen bestimmten Konsens in der Sequenz aufweisen (vgl. Abb. 1.9). Je nach Grad der Übereinstimmung zwischen einer untersuchten Sequenz mit diesen Sequenzen kann vorausgesagt werden, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass an diesen Stellen Spleißen stattfindet. Die Analyse der 5'SS von *MCPH1* mit dem Algorithmus *NNSPLICE* [84], welcher die Sequenz von 15 Nukleotiden um die 5'SS herum berücksichtigt, ergab für Intron 8 einen Wert von 0,69 auf einer Skala von 0 bis 1. Dieser Wert ist auffällig niedrig verglichen mit den restlichen Introns, deren Werte alle im Bereich zwischen 0,94 und 1 lagen, wie aus Tabelle 4.1 ersichtlich ist.

Tabelle 4.1 *5'ss-Werte der MCPH1-Introns**

Exon/Intron	Sequenz	NNSPLICE	Screen 3.4
1	ATCCTGAAAGgtgaggtact	0,94	15,7
2	GGGGGCAAAGgtaagacact	1,00	17,1
3	GGGTGGAAAAgtaagcagtt	0,98	12,6
4	TAAAAAAAAAgtaagtacat	0,99	16,1
5	ACAAATCTAGgtaagctaag	1,00	17,1
6	TCCCCCACCTgtaagtaatt	0,94	15,7
7	TTGTGTTCAGgtaaaatttt	0,90	15,8
8	TACAGTGGAAgtatgtgaat	**0,69**	**11,1**
9	AGGCAAAAAGgtcagtgtgt	0,94	16,3
10	TGCCATCTGAgtaagtactt	0,99	15,7
11	TTATGATTGGgtaagccctg	0,99	15,0
12	TGCAGCTCCCgtaagtcaga	0,98	14
13	TGGGTCTTAGgtaagaatcc	1,00	18,6

*Die Werte wurden mit *NNSPLICE* und *Screen 3.4* ermittelt. In Großbuchstaben sind die exonische und in Kleinbuchstaben die intronische Sequenzen angegeben.

Ein anderes Programm (*Screen 3.4*) berechnet die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen U1-snRNP und 5'SS[1]. Auch dieser Algorithmus lieferte den niedrigsten Wert (11,1) für die 5'SS von Intron 8. Die relativ schwache 5'SS von Intron 8 scheint das Skippen von Exon 8 in einem Teil der *MCPH1*-Transkripte zu begünstigen, wodurch sich die Existenz von *MCPH1Δe8* erklären lässt.

[1]Durch Bindung von U1-snRNP an die Ziel-mRNA wird eine Spleißstelle markiert und die Formation des Spleißosoms stimuliert [53].

4.1.6 Promotoranalyse des *MCPH1*-Gens

Bis *dato* sind keine Studien über Promotoren des *MCPH1*-Gens veröffentlicht. Aus diesem Grund wurde die Gensequenz von *MCPH1* nach Promotor-Elementen durchsucht. Dazu wurde das Programm *Gene2Promoter* verwendet. Mit dessen Hilfe wurden zwei Regionen mit potentieller Promotor-Aktivität vorhergesagt. Diese Regionen wurden als Prom1 und Prom2 bezeichnet (Abb. 4.6). Eine der beiden, Prom1, umfasste einen Bereich von 745 bp um Exon 1 beginnend 471 bp aufwärts des 1. ATG-Startcodons. Die zweite Region umfasste 600 bp beginnend im Intron 3, 348 bp aufwärts des Exons 4. Um die Funktionalität dieser beiden Regionen zu untersuchen, wurde ein *Dual-Luciferase® Reporter Assay* verwendet. Das Prinzip dieser Methode ist in Abschnitt 3.8 beschrieben.

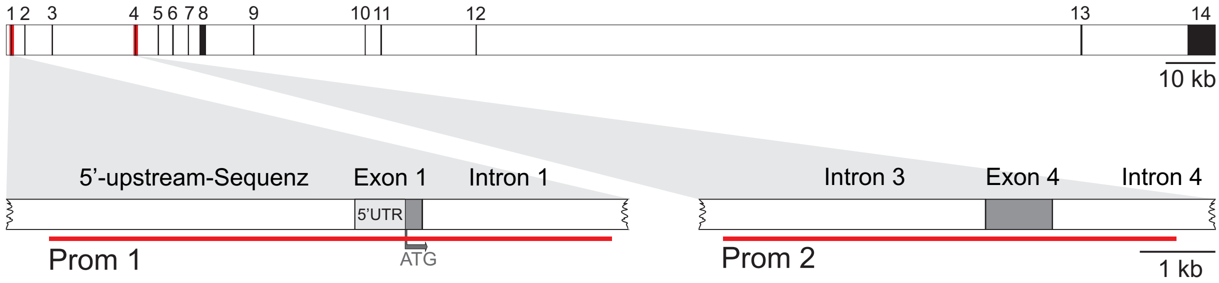


Abbildung 4.6 *Promotor-Analyse im MCPH1-Gen. Die Positionen von zwei Sequenzen mit mutmaßlicher Promotoraktivität sind durch rote Linien markiert. Durch offene Balken sind Intron-, durch gefüllte Balken Exonbereiche maßstabsgetreu dargestellt. Mit dem Pfeil wird die Position der Translationsstartpunktes markiert.*

Die vermeintlichen Promotor-Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pGL3 einkloniert. Die Konstrukte wurden in HEK293-, HeLa- bzw. 562T-Zellen transfiziert und die Luciferase-Aktivität (Luc-) für jedes Konstrukt bestimmt. Für HEK293-Zellen, die mit pGL3:SV40 transfiziert waren, wurde eine Luc-Aktivität von 0,548 RLU (*relative light units*) gemessen. Diese wurde gleich 100 % gesetzt und diente als oberer Referenzwert (Abb. 4.7). Für den leeren pGL3-Vektor wurde, wie erwartet, eine schwache Luc-Aktivität (3 %) nachgewiesen, die dem Hintergrundrauschen entsprach. pGL3:Prom1 resultierte in einer Aktivität von 235 % in HEK293-Zellen, wodurch die Funktionalität dieser Sequenz als Promotor bestätigt wurde. Das Einklonieren von Prom1 in Rückwärtsorientierung (*reverse-complement*, rcProm1) resultierte in einer noch höheren Luc-Aktivität (357 %), wodurch man auf eine Bidirektionalität dieses Promotors schließen kann. Tatsächlich ist in der NCBI-Datenbak ein bisher nicht charakterisiertes Gen annotiert (LOC100287015), dessen 5'-Ende an Exon 1 des *MCPH1*-Gens grenzt und dessen Leseraster eine zum *MCPH1* entgegengesetzte Orientierung aufweist. Für HeLa-Zellen und 562T-Fibroblasten, die ebenfalls mit Prom1 oder rcProm1 transfiziert wurden, wurden

ähnliche Aktivitäten beobachtet (Abb. 4.7). Für Prom2 wurde dagegen eine viel schwächere Luc-Aktivität nachgewiesen. Während in HEK293-Zellen 44 % gemessen wurden, waren in HeLa und 562T nur 5 % bzw. 3 % nachweisbar. Mit rcProm2 wurden in allen drei Zelllinien Luc-Aktivitäten vergleichbar mit dem leeren pGL3-Vektor gefunden. Demnach scheint nur die Region Prom1 eine Promotor-Aktivität zu besitzen.

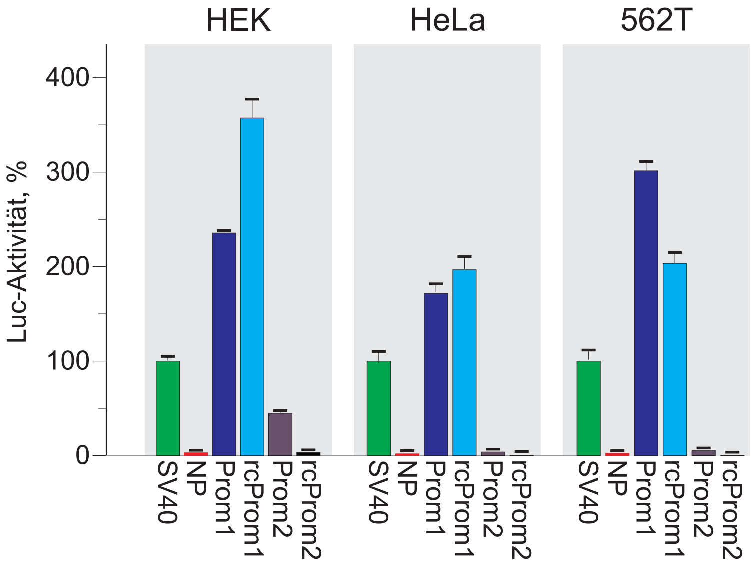


Abbildung 4.7 *Promotor-Analyse im MCPH1-Gen. Luc-Aktivitäten induziert in HEK293-, HeLa- und 562T-Zellen durch das jeweilige Konstrukt wie angegeben. NP bezeichnet den pGL3-Vektor ohne Promotor. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen aus drei Messungen wieder.*

4.1.7 Quantitative Expressionsanalyse von *MCPH1*

4.1.7.1 Etablierung einer Transkript-spezifischen qPCR

Mittels RT-PCR ließ sich die Expression der einzelnen *MCPH1*-Transkriptvarianten (*FL*, *Δe9-14* und *Δe8*) qualitativ nachweisen, es konnte aber keine Aussage darüber getroffen werden, wie stark die Expression der einzelnen Varianten ist. Anfänglich wurde versucht, mit Hilfe der Northern-Blot-Methode die Höhe der Expression der *MCPH1*-Varianten zu bestimmen. Eine ingesamt niedrige Expression von *MCPH1* trug dazu bei, dass die Detektion der *MCPH1*-Transkripte über diese Methode nicht gelang. Als alternative Methode kam quantitative Real-Time-PCR (qPCR) in Frage. Die Amplifikationsprimer wurden dabei so konzipiert, dass mit jedem Primerpaar nur eine der Transkriptvarianten spezifisch amplifizierbar sein sollte. So flankierten die Primersequenzen für *MCPH1-FL* eine Region, die Bereiche aus Exon 8 und 9 einschloss (Abb. 4.8A). Um *MCPH1Δe8* spezifisch zu amplifizieren, wurde ein for-Primer verwendet, der den Übergang zwischen Exons 7

und 9 überspannte und ein rev-Primer, der komplementär zu einer Region von Exon 10 war. Zur Amplifikation eines *MCPH1Δe9-14*-spezifischen Produkts wurden Primer komplementär zum äußersten 5'-Bereich von Intron 8 gewählt, so dass die Amplifikation aller *Δe9-14*-Varianten mit unterschiedlich langen 3'UTRs gewährleistet werden sollte.

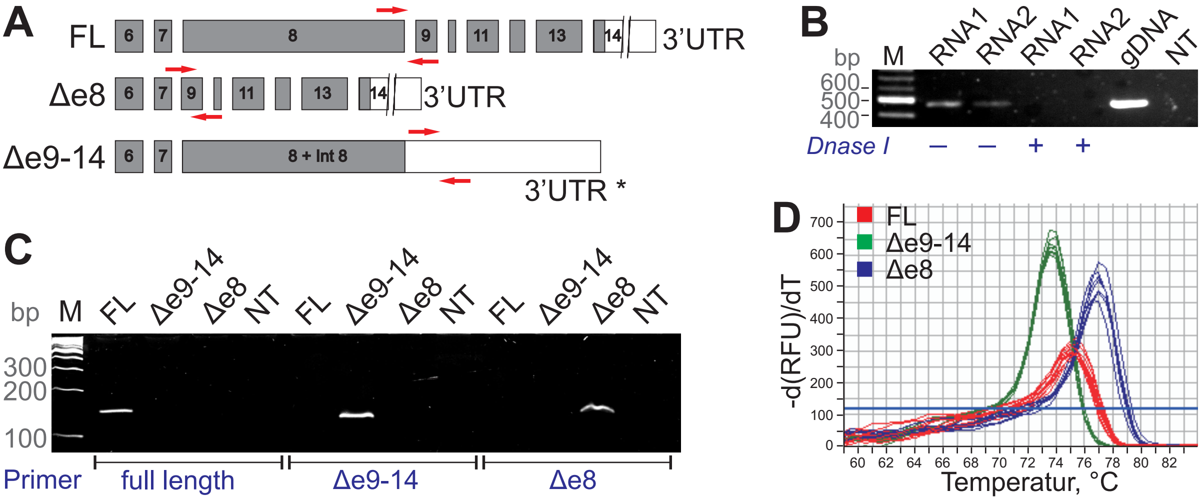


Abbildung 4.8 *MCPH1-spezifische quantitative Real-Time-PCR.* ***A****. Positionen der Amplifikationsprimer. Die Exons sind durch Rechtecke wiedergegeben. Die roten Pfeile symbolisieren die Primer, die spezifisch für jede der Varianten sind.* ***B****. Nachweis von gDNA in RNA-Präparationen mittels PCR mit Intron-spezifischen Primern: Erst durch die zusätzliche Behandlung mit DNase I konnte die gDNA-Kontamination eliminiert werden.* ***C****. Überprüfung der Primerspezifität: PCRs mit Transkript-spezifischen Primerpaaren und den zugehörigen Templates ergaben Produkte, mit falschen Templates dagegen nicht; NT – non-Template-Kontrolle.* ***D****. Schmelzkurvenanalyse für Amplifikate, die aus PCRs mit Transkript-spezifischen Primerpaaren resultierten. Die Einzelpeaks kennzeichnen die Reinheit der einzelnen PCR-Produkte. Die Änderung der SYBR®Green-Fluoreszenzintensität (vertikale Achse, RFU: realtive fluorescence units) ist gegen die Temperatur (horizontale Achse) aufgetragen.*

Da die Primerbindungsstellen für die Variante *Δe9-14* auch in gDNA vorhanden sind, musste sichergestellt werden, dass die isolierte RNA frei von Kontamination mit gDNA war. Laut Angaben des Herstellers des RNA-Isolierung-Kits sollte dies der Fall sein, einerseits weil die verwendete RNA-Bindungsmatrix geringere Affinität für DNA als für RNA hat und anderseits weil in die RNA-Isolierungsprozedur ein DNase-Verdau-Schritt integriert ist. Trotzdem wurde in einem PCR-Ansatz mit Intron-spezifischen Primern gDNA-Kontamination in den RNA-Proben nachgewiesen (Abb. 4.8B). Daher wurden die gereinigten RNA-Proben einem zusätzlichen DNase-Verdau unterzogen, wobei der *Turbo DNA-freeTM Kit* (Ambion) verwendet wurde. Dadurch wurde jegliche gDNA-Kontamination komplett eliminiert, wie Abb. 4.8B zeigt.

Zur DNA-Detektion bei der qPCR wurde der Farbstoff *SYBR®Green* verwendet, der in doppelsträngige (ds-) DNA-Moleküle interkaliert. Zur exakten Quantifizierung war es

wichtig, die PCR-Bedingungen so zu wählen, dass keine unspezifischen Amplifikationen stattfanden. Um dies zu überprüfen, wurden Schmelztemperaturprofile der Amplifikate nach der PCR-Reaktion erstellt. Da die Schmelztemperatur einer bestimmten dsDNA von ihrer Länge und ihrem GC-Anteil abhängt, kann man anhand einer Schmelzkurve feststellen, ob sich in einer PCR-Reaktion mehrere Amplifikationsprodukte gebildet haben. Abb. 4.8D zeigt die Schmelzkurven der Amplifikate, die mit den jeweiligen Primerpaaren für die einzelnen Transkript-Varianten entstehen. Die Einzelpeaks deuten darauf hin, dass jeweils nur ein einziges PCR-Produkt vorliegt, wodurch die Qualität der PCR-Reaktionen bestätigt wird. Zusätzlich sollte deren Spezifität überprüft werden, ob nämlich mit dem jeweiligen Primerpaar nur die entsprechende Variante amplifiziert wird. In PCRs, in denen das FL-Primerpaar mit einem Template kombiniert war, das aus einem Plasmid mit eingeklonierten *MCPH1Δe8* oder *MCPH1Δe9-14* bestand, waren keine Produkte nachweisbar. Analog galt das auch für die anderen Primerpaare in Verbindung mit den falschen Templates (Abb. 4.8C).

4.1.7.2 Expressionsprofil der *MCPH1*-Transkriptvarianten in humanen Geweben

Ein Expressionsprofil für *MCPH1* wurde mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR bereits durchgeführt und bei Jackson et al. beschrieben [28]. Allerdings wurde in dieser Studie nicht zwischen den *MCPH1*-Varianten unterschieden, da die verwendeten Amplifikationsprimer eine allen Transkriptformen gemeinsame Region zwischen Exon 1 und 6 flankierten. Daher entstand die Frage, ob es Gewebe-spezifische Unterschiede in Expression der einzelnen Varianten gäbe. Um diese Frage zu klären, wurde eine kommerziell erhältliche Palette von cDNA-Proben aus verschiedenen adulten und fötalen humanen Geweben (*Multiple tissue cDNA panels*, Clontech) mit oben beschriebenen Primerpaaren für eine qPCR verwendet. Als interne Kontrolle wurden Transkripte von vier sogenannten "Haushalts"-Genen (HKG, *housekeeping genes*) amplifiziert: Ubiquitin C (*UBC*), Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*), Beta-2-Microglobulin (*B2M*) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase I (*HPRT1*). Die ermittelten Werte für die jeweilige Variante wurden gegen den geometrischen Mittelwert der relativen Expression der vier HGK normalisiert [85].

Das Ergebnis der Quantifizierung der MCPH1-Transkriptformen ist in Abb. 4.9 gezeigt. Vergleicht man adulte Gewebe untereinander, dann war *MCPH1-FL* am höchsten in Proben aus Testis, Plazenta und Pankreas mit ca. 9 000 (± 943) Kopien pro 1 ng Gesamt-cDNA exprimiert. *MCPH1Δe9-14* war ebenfalls am höchsten in Testis, aber auch in Ovarien mit 11 000 (± 708) bzw. 8 400 (± 560) Kopien exprimiert.

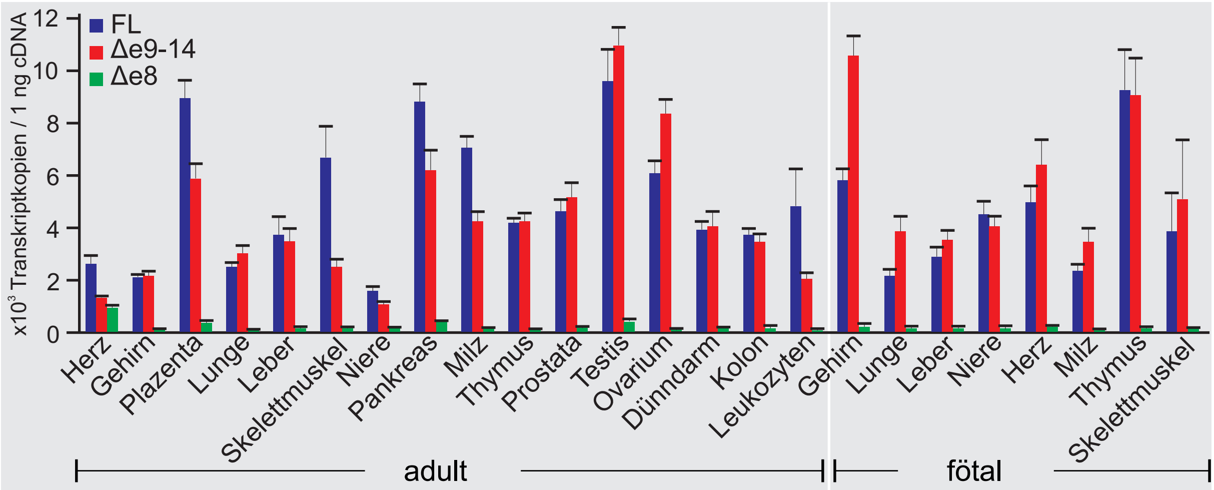


Abbildung 4.9 *Quantifizierung der Expression von MCPH1-FL (blau), MCPH1Δe9-14 (rot) und MCPH1Δe8 (grün) in den angegebenen adulten bzw. fötalen Geweben. Die Werte stellen Transkript-Kopienzahlen pro ng Gesamt-cDNA dar, normalisiert gegen den geometrischen Mittelwert von 4 HKG (s. Text). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen aus drei Experimenten wieder.*

Ein Unterschied zeigte sich zwischen einigen adulten und fötalen Geweben. So wurde in Proben aus Gehirn, Herz, Niere und Thymus im fötalen Stadium eine höhere Expression der beiden Transkriptformen als in ihren adulten Pendants detektiert (Abb. 4.10). Bemerkenswert ist der große Unterschied der *MCPH1*-Expression im Gehirn. So fanden sich im fötalen Hirngewebe 10 570 (± 815) Kopien von *MCPH1Δe9-14*, während im adulten Gehirn diese Variante mit nur 2 170 (± 179) Kopien repräsentiert war. Auch für *MCPH1-FL* wurde eine doppelt so hohe Expression im fötalen Hirngewebe beobachtet. Dieses Ergebnis legt zusätzlich zu dem mikrozephalen Phänotyp der MCPH1-Patienten eine bedeutsame Rolle von Microcephalin im sich entwickelndem Gehirn nahe. Zudem zeigte qPCR, dass *MCPH1-FL* und *MCPH1Δe9-14* in meisten getesteten Proben ähnlich stark exprimiert waren. Eine Ausnahme bildeten Proben aus Skelettmuskel und Leukozyten, in denen das *FL*-Transkript im Vergleich zu *MCPH1Δe9-14* eine dreifach höhere Expression aufwies. Im fötalen Gehirn war dagegen *MCPH1Δe9-14* um den Faktor 1,8 stärker vertreten als *MCPH1-FL*. Im Ge-

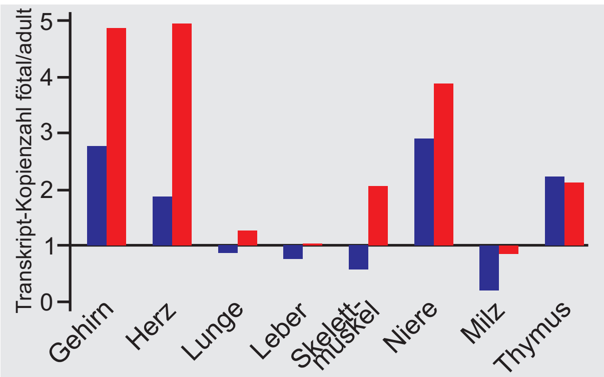


Abbildung 4.10 *Vergleich der entwicklungsabhängigen Expression von MCPH1-FL (blau) und MCPH1Δe9-14 (rot). Die Werte stellen Quotienten der Transkript-Kopienzahl zwischen fötalen und adulten Geweben dar. >1: überexprimiert im fötalen Stadium; <1: überexprimiert im adulten Stadium.*

gensatz zu den beiden beschriebenen Varianten war *MCPH1Δe8* sehr schwach exprimiert. Wie in fötalen so auch in adulten Geweben wurden höchstens 940 Kopien/ng cDNA detektiert, vergleichbar mit dem Hintergrundrauschen. Wegen dieser schwachen Expression ist *MCPH1Δe8* eher als ein Nebenprodukt des Spleißvorgangs anzusehen, das aus schwachen 5'SS von Intron 8 resultiert, wie im Abschnitt 4.1.5 gezeigt wurde. Die mit *MCPH1-FL* vergleichbare Expressionshöhe von *MCPH1Δe9-14* ist dagegen ein Indiz für deren funktionelle Relevanz.

4.1.7.3 Zellzyklus-abhängige Expression von *MCPH1*

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob die Transkription von *MCPH1*-Varianten einer Zellzyklus-spezifischen Regulation unterliegt. Um dies zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mittels der Methode des doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert (Abschnitt 3.1.5). In bestimmten Zeitabständen nach Aufhebung des zweiten Thymidin-Blocks, wie diese in Abb. 4.11A angegeben sind, wurden Zellen geerntet. Ein Teil wurde für die Zellzyklusbestimmung, der andere Teil für die RNA-Isolierung verwendet. Die durchflusszytometrische Analyse von DAPI-gefärbten Zellen zeigte, dass nach dem Thymidin-Block die Zellen am Übergang von G1- zur S-Phase arretiert waren (Abb. 4.11B). In den nächsten 4 Stunden passierten die Zellen die S-Phase, um nach 6 Stunden die G2-Phase zu erreichen und dann synchron die Mitose zu durchlaufen. Nach 12 Stunden befand sich die Zellpopulation fast ausschließlich in der G1-Phase. Die Zellzyklusanalyse ergab, dass der Grad der Synchronie bei über 80 % lag.

qPCR mit den Transkript-spezifischen Primern zeigte, dass die mRNA-Konzentration von *MCPH1-FL* von der mittleren S- bis in die G2-Phase des Zellzyklus hinein abnahm (Abb. 4.11C). Im Gegensatz dazu waren die Transkriptkonzentrationen von *MCPH1Δe9-14* während der frühen S-Phase niedriger als die von *MCPH1-FL*, stiegen aber ab der mittleren S- bis in die G2-Phase an und blieben dann bis in die G1-Phase konstant. In der G1-Phase waren beide Varianten ähnlich stark vertreten. Die Konzentrationen von *MCPH1Δe8* waren zu allen Zeitpunkten sehr niedrig. Ihr zeitlicher Verlauf ähnelte demjenigen von *MCPH1-FL*. Die Gesamtkonzentration aller *MCPH1*-Varianten war zu allen betrachteten Zeiten annähernd konstant. Die Transkriptionsstärke der Referenzgene *GAPDH* und *B2M* zeigte keine Änderung zwischen den Proben, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass die Schwankungen in der Expressionsstärke von *MCPH1* eine Folge der unterschiedlichen Ausgangsmaterialkonzentrationen bzw. der Synchronisierungsprozedur darstellten. Da alle hier untersuchten Transkriptforme gleiche 5'-Region aufweisen (wie im Abschnitt 4.1.2 mittels 5'RACE-Analyse gezeigt), muss deren Expression vom gleichen Promotor gesteuert werden. Daher deutet die beobachtete Zellzyklus-abhängige aber

gleichzeitig zueinander gegensätzliche Zu- und Abnahme der *MCPH1-FL* und -*Δe9-14*-Varianten auf eine gezielte posttranskriptionelle Regulation hin.

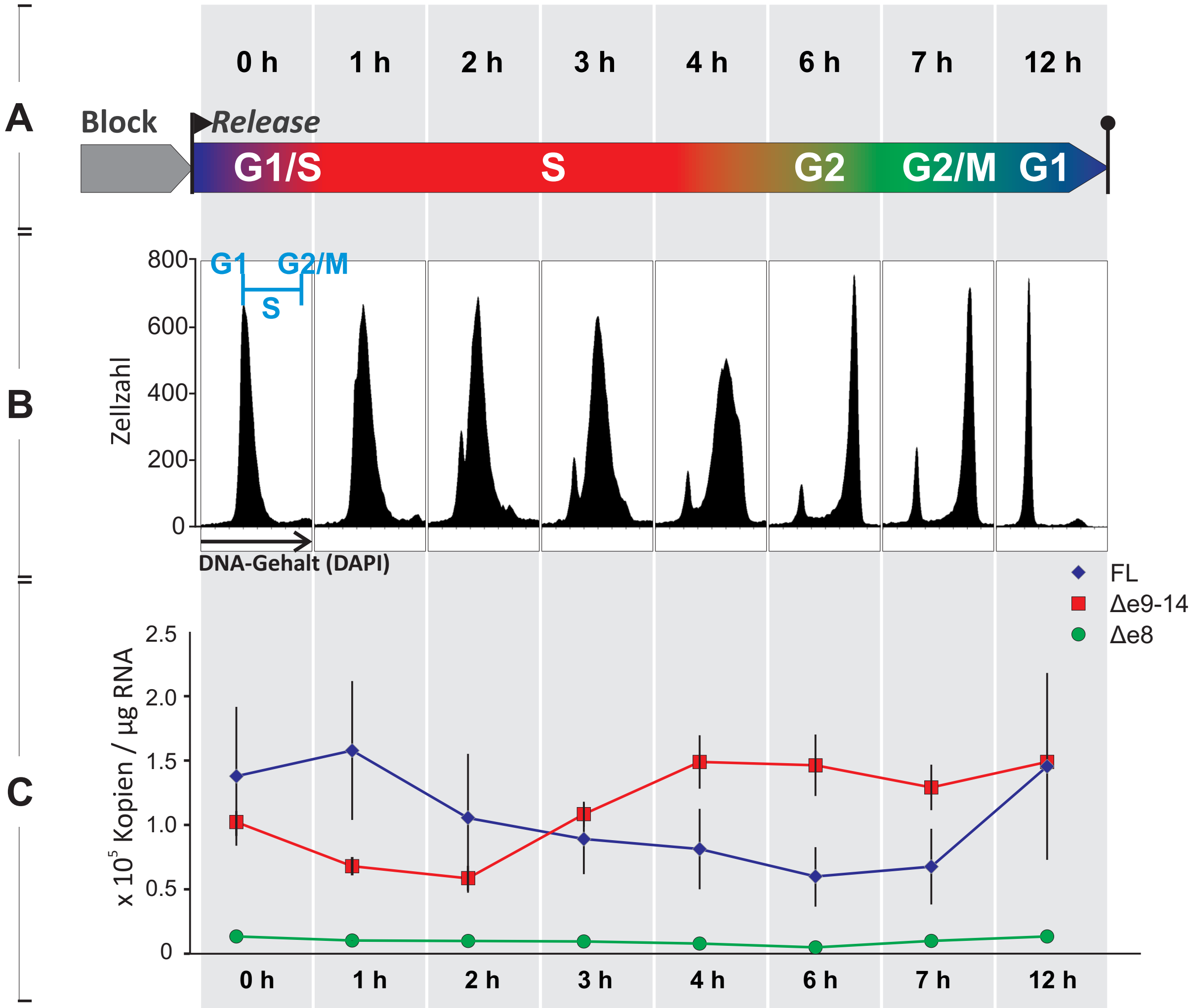


Abbildung 4.11 *Zellzyklus-abhängige Expression der MCPH1-Transkriptformen.* ***A****. Schematische Darstellung der Synchronisierungsprozedur. Die Zellen wurden zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 12 h nach Aufhebung des zweiten Thymidin-Blocks geerntet. Der Farbverlauf verdeutlicht den Ablauf des Zellzyklus von G1 (blau) über S (rot) und G2 (grün) nach G1.* ***B****. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse der synchronisierten HeLa-Zellen. Die Zellzahl (vertikale Achse) ist gegen den DNA-Gehalt (DAPI, horizontale Achse) aufgetragen.* ***C****. Expressionsstärke von MCPH1-FL, -Δe9-14 und -Δe8 in den gleichen synchronisierten HeLa-Zellen wie in B, bestimmt mittels qPCR. Die Werte stellen Mittelwerte mit Standardfehlern aus drei Experimenten dar und sind normalisiert gegen die Expression von GAPDH und B2M.*

4.2 Komplementation von MCPH1-defizienten Zellen

4.2.1 Retrovirale Transduktion

MCPH1-defiziente Patientenzellen zeigen einen erhöhten Anteil an Prophase-ähnlichen Zellen (PLCs). Dieser Phänotyp konnte mittels RNA-Interferenz in Zellen mit intaktem *MCPH1*-Gen erzeugt werden [21]. Allerdings wurden bisher keine Arbeiten über die Komplementierung von PCC in humanen Zellen veröffentlicht. Eigene Vorversuche zeigten, dass eine Überexpression von *MCPH1* toxisch auf die Zellen wirkt, wodurch eine Etablierung von proliferierenden Zellen mit ektopischer, nicht regulierbarer *MCPH1*-Expression nicht möglich war. Deswegen kam ein retrovirales Transduktionssystem mit regulierbarem Promotor zum Einsatz. Es wurde dabei der lentivirale Vektor pCL1THPC verwendet, welcher einen *Tet*-Operator (*TetO*) enthält. *TetO* dient als Bindungsstelle für die tTR-Domäne des Hybridproteins tTR-KRAB. Die KRAB-Domäne, die dem humanen KOX1 entstammt, kann die Transkription in einem Bereich von bis zu 3 kb von der Bindungsstelle orientierungsunabhängig unterdrücken. In Abwesenheit des Tetracyclin-Analogons Doxycyclin (Dox) bindet tTR-KRAB spezifisch an *TetO* und hemmt auf diese Weise die Aktivität der nächstliegenden Promotoren. Eine Zugabe von Dox verhindert die tTR-KRAB-Bindung konzentrationsabhängig mit der Folge, dass die Expression eines in Abhängigkeit des regulierten Promotors klonierten Gens angeschaltet wird [86]. Abb. 4.12 veranschaulicht das beschriebene Prinzip. Die *tTR-KRAB*- und *TetO*-Sequenzen befanden sich auf zwei Vektoren, puc2CL1KRABIN bzw. pCL1THPC, welche freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hanenberg (Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurden.



Abbildung 4.12 *Schematische Darstellung der Dox-abhängigen Transrepression. In Abwesenheit von Dox bindet tTR-KRAB an TetO und unterdrückt dadurch die Promotoraktivität. Durch Zugabe von Dox wird die Bindung von tTR-KRAB an TetO gehindert, wodurch die Expression der einklonierten cDNA stattfinden kann.*

Die kodierenden Sequenzen von *MCPH1-FL* sowie der Varianten *-Δe9-14*, *-Δe8* oder *-Δe1-7*[2] wurden in den Vektor pCL1THPC *in frame* abwärts der *EGFP*-Sequenz als Fusionskonstrukt einkloniert. Darauf folgend wurde die kodierende Region des *Neomycin-Phosphotransferase-II*-Gens (*NeoR*) abwärts der *MCPH1*-Sequenz und einer *IRES*-Region in den Vektor eingefügt, um ein bicistronisches Konstrukt zu erzielen. Die Konstrukte trugen die Bezeichnung pCL1THPC.EGMCPH1(FL/Δe9-14/Δe8/Δe1-7)IN. Als Kontrolle diente der Vektor mit *EGFP*-Sequenz allein. Als nächstes wurde die *NeoR*-Kassette im Vektor puc2CL1.KRABIN durch die Gensequenz für die Hygromycinresistenz (*Hygromycin-B-Phosphotransferase*) ersetzt. Das neue Konstrukt wurde als puc2CL1.KRABIH bezeichnet. Der Einfachheit halber werden die Vektoren nachfolgend entsprechend den exprimierten Produkten genannt: KRAB, GFP, GFP-MCPH1FL usw. Die Orientierung und die Richtigkeit der einklonierten Sequenzen wurden durch Sequenzierung überprüft und bestätigt. Die Vektorkarten und eine detaillierte Darstellung der Klonierungsstrategien werden im Anhang gezeigt.

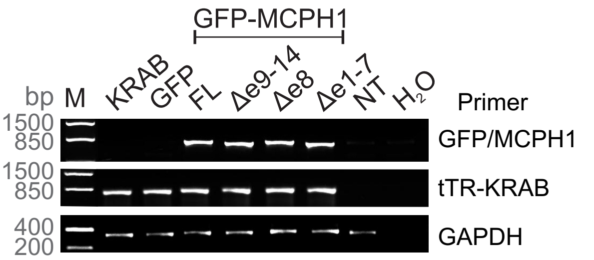


Abbildung 4.13 *Integration von transduzierten Konstrukten in das Genom von 562T-Zellen. PCR mit gDNA aus Zellen transduziert mit dem Vektor puc2CL1.KRABIH (KRAB) allein bzw. mit puc2CL1.KRABIH und zusätzlich mit dem Vektor pCL1THPC für die Expression von GFP, GFP-MCPH1-FL, -Δe9-14, -Δe8 oder -Δe1-7. NT bezeichnet nicht transduzierte Zellen. Die Amplifikation von GAPDH diente als Qualitätskontrolle der DNA.*

Die retroviralen Transduktionen wurden in einer Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Hanenberg durchgeführt. Für die Transduktion wurden HeLa-Zellen sowie transformierte Fibroblasten 562T von einem Mikrozephalie-Patienten verwendet, der homozygoter Träger der trunkierenden Mutation c.427dupA (p.T143NfsX5) im *MCPH1*-Gen ist. Die transduzierten Zellen wurden mit den Antibiotika Hygromycin B und G418 selektioniert. Um zu überprüfen, ob die Konstrukte in das Genom der transduzierten Zellen integriert waren, wurde DNA aus diesen Zellen isoliert und PCRs mit *GFP*-spezifischen for- bzw. *MCPH1*-spezifischen rev-Primern durchgeführt. Es waren Banden mit der zu erwartenden Größe (800 bp) bei den Proben aus den mit GFP-MCPH1-Konstrukten transduzierten Zellen zu sehen, welche bei den Zellen fehlten, die mit GFP-Vektor bzw. mit KRAB-Vektor allein transduziert waren (Abb. 4.13). PCRs mit *KRAB*-spezifischen Primern zeigten, dass alle KRAB-transduzierten Zellen dieses Konstrukt integriert hatten.

[2] Die Deletionsvariante MCPH1Δe1-7 wird im Abschnitt 4.2.3 näher erläutert.

4.2.2 Expression von MCPH1-Isoformen mit GFP-Tag

Die Expression von GFP-MCPH1-Fusionsproteine in transduzierten 562T-Fibroblasten wurde immunologisch untersucht. Zunächst wurde die Dox-Konzentration bestimmt, die notwendig für die Expression der transduzierten Konstrukte ist. Dazu wurde Dox in Konzentrationen von 0,01 ng/ml bis 1000 ng/ml dem Zellkulturmedium hinzugefügt. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und Gesamtproteinextrakte hergestellt, die dann im Western-Blot aufgearbeitet wurden. Immundetektion mit einem GFP-spezifischen Antikörper zeigte, dass ab einer Dox-Konzentration von 1 ng/ml die Transkriptionsunterdrückung durch tTR-KRAB aufgehoben und die Expression des Fusionsproteins induziert wird (Abb. 4.14). Die Bandenintensitäten von GFP und des Kernmatrixproteins p84, das als Ladungskontrolle diente, wurden densitometrisch bestimmt und das Verhältnis dieser beiden für die jeweilige Probe errechnet. Die Ergebnisse zeigt das Diagramm in Abb. 4.14. Danach findet eine maximale Expression von MCPH1 erst ab Dox-Konzentrationen von 10 ng/ml statt. Da diese wegen der Gefahr der Toxizität einer Überexpression von MCPH1 nicht erwünscht war, wurde für die folgenden Versuche die Konzentration auf 1 ng/ml Dox für die Induktion der GFP-MCPH1-Expression begrenzt.

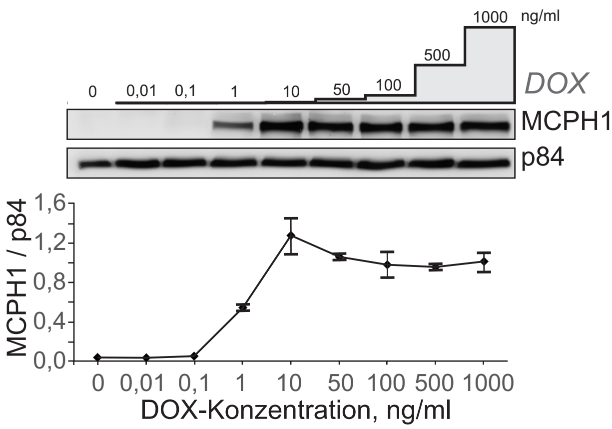


Abbildung 4.14 *Dox-abhängige Expression von GFP-MCPH1-Fusionsprotein in mit GFP-MCPH1-FL und tTR-KRAB transduzierten 562T-Zellen. Das Stufenhistogramm (oben) verdeutlicht ansteigende Dox-Konzentrationen. Die Präsens und Stärke von GFP-MCPH1-FL- und p84-Banden sind auf Immunoblots darunter dargestellt. Das Diagramm (unten) zeigt das Verhältnis von GFP-MCPH1 zu p84 (Ladungskontrolle) in Abhängigkeit von der Dox-Konzentration.*

Auch die Expression der anderen MCPH1-Varianten wurde mit dem α-GFP-Antikörper untersucht (Abb. 4.15). Banden entsprechend der Größe des jeweiligen Polypeptids wurden mittels Western-Blot detektiert. Kein spezifisches GFP-Signal war erwartungsgemäß in Proteinextrakten aus nicht transduzierten Zellen bzw. aus Zellen zu sehen, die nur mit dem KRAB-Vektor transduziert waren. Zusätzliche Banden niedermolekularer Größe resultierten vermutlich aus Degradationsprodukten der exprimierten Proteine.

Die gleichen GFP-MCPH1-Banden wie mit dem α-GFP-Antikörper waren auch mit kommerziell erhältlichen MCPH1-spezifischen Antikörpern nachweisbar – nämlich mit ab2612 (Abcam) und AF3998 (R&D). Mit AF3998 waren alle MCPH1-Isoformen detektierbar.

Dagegen erkannte ab2612 das GFP-MCPH1Δe8-Polypeptid nicht, was darauf zurückzuführen ist, dass das Erkennungsepitop dieses Antikörpers im von Exon 8 kodierenden Bereich des Microcephalin-Proteins liegt (Angabe des Herstellers). Ferner trat mit ab2612 eine zusätzliche unspezifische Bande bei 150 kDa auf.

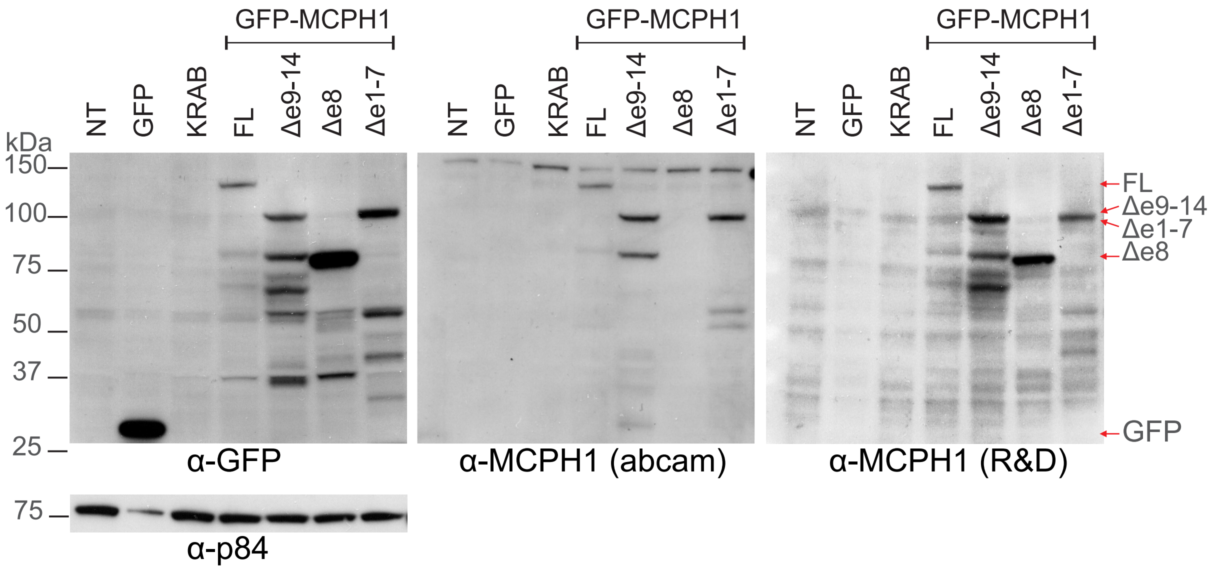


Abbildung 4.15 *Expression unterschiedlicher GFP-MCPH1-Fusionsproteine in 562T-Zellen. Am oberen Rand sind die transduzierten Konstrukte bezeichnet (NT: nicht transduziert), am rechten Rand ist die Identität der Banden erklärt und am unteren Rand sind die verwendeten Antikörper angegeben. Es handelt sich um sequenzielle Färbungen ein und derselben Immunoblot-Membran in dargestellter Reihenfolge. Das Kernmatrixprotein p84 diente als Ladungskontrolle.*

4.2.3 Komplementation von PCC

Um die Komplementationsfähigkeit der MCPH1-Isoformen zu untersuchen, wurden Chromosomenpräparate aus transduzierten 562T-Zellen hergestellt und der Anteil von PLCs sowie von mitotischen Zellen bestimmt (Abb. 4.16). Die Chromosomenpräparationen zeigten, dass alle drei MCPH1-Isoformen den PCC-Phänotyp in Patienten-Fibroblasten komplementierten. Während der Anteil von PLCs in nicht transduzierten Zellen mit 16 % typisch für das PCC-Syndrom war, zeigten Zellen, die GFP-MCPH1-FL, -Δe9-14 bzw. -Δe8 exprimierten, eine reduzierte, im Normalbereich liegende Rate von PLCs (0,3 – 1,3 %). Dagegen konnte die alleinige Expression von GFP den Anteil von PLCs in 562T-Zellen nicht reduzieren, welcher bei diesen Zellen bei 21 % lag.

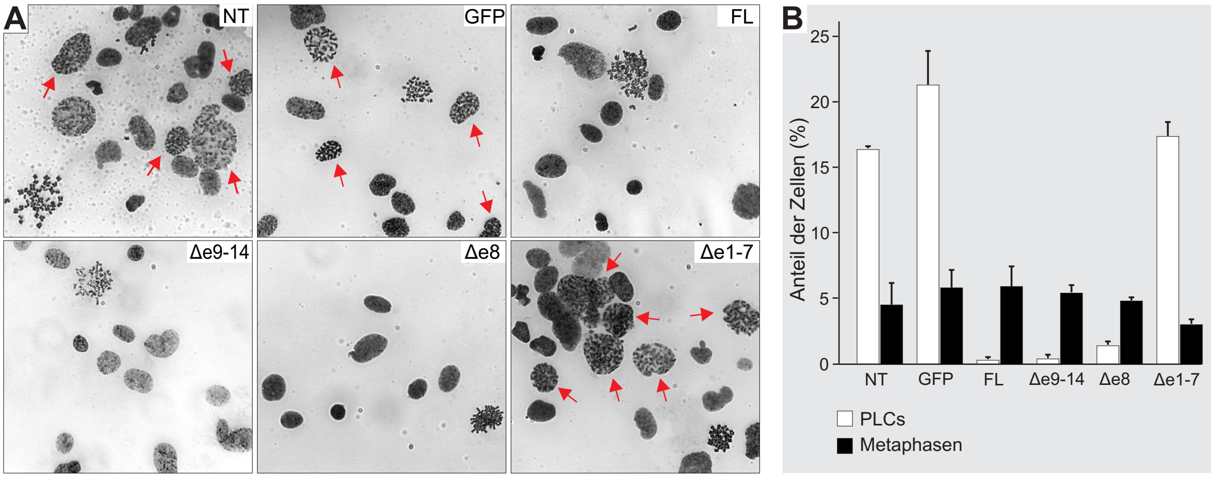


Abbildung 4.16 *Komplementation von PCC durch MCPH1-Isoformen in der MCPH1-defizienten Zelllinie 562T. **A**. Chromosomenpräparate aus nicht-transduzierten (NT) bzw. transduzierten Zellen wie angegeben. Rote Pfeile zeigen PLCs. **B**. Der Anteil der PLCs (weiße Säulen) und der mitotischen Zellen (schwarze Säulen) wurde durch Auszählung von jeweils 1000 Zellkernen bestimmt. Die Fehlerindikatoren geben Standardabweichungen aus drei unabhängigen Zählungen wieder.*

Beim Vergleich der Proteinsequenzen der drei komplementierenden Varianten wurde festgestellt, dass die N-terminale BRCT-Domäne gemeinsame Komponente von MCPH1-FL und der Isoformen Δe9-14 und Δe8 darstellt. Außerdem liegen alle bisher in der Literatur beschriebenen Mutationen von MCPH1-Patienten im Bereich der ersten 7 Exons des *MCPH1*-Gens [21, 28, 41, 40]. Aus diesen Gründen war die Vermutung naheliegend, dass die Region von MCPH1, die von Exons 1 bis 7 kodiert wird, für die Verhinderung des Auftretens von PCC verantwortlich ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die kodierende Region von *MCPH1* ohne die Exons 1 – 7 (*MCPH1Δe1-7*, Abb. 4.17) in den lentiviralen Vektor pCL1THPC auf die gleiche Weise einkloniert wie für die anderen Konstrukte beschrieben. Dieses Konstrukt kodiert für Microcephalin mit deletierter N-terminaler BRCT-Domäne, wie Abb. 4.17 zeigt. Die Integration und die Expression dieser Variante in 562T-Zellen wurden mittels PCR und Western-Blot überprüft und bestätigt (Abb. 4.13 und 4.15). Im Einklang mit der aufgestellten Vermutung lag die Rate von PLCs in 562T-Zellen, in denen MCPH1Δe1-7 exprimiert wurde, bei 17 %, ähnlich wie bei nicht transduzierten Zellen. Dieses Resultat bestätigt die Annahme, dass die N-terminale Region des Microcephalins für Komplemen-

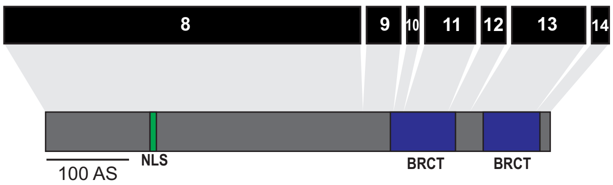


Abbildung 4.17 *Exonzusammensetzung der Deletionsvariante MCPH1Δe1-7 (oben). Dem entsprechenden Polypeptid fehlt die N-terminale BRCT-Domäne (unten).*

tation von PCC unentbehrlich ist. Da der mitotische Index in allen Präparaten in einer ähnlichen Größenordnung lag (5 % ±0,8 %), kann ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede zwischen den PLC-Raten auf unterschiedlichen Zellproliferation beruhen. Die quantitativen Ergebnisse aller PCC-Untersuchungen sind in Abb. 4.16B zusammengefasst.

Diese Ergebnisse wurden durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie zusätzlich verifiziert. Dazu wurden die 562T-Zellen, die GFP-MCPH1-Fusionsproteine exprimierten, fixiert und mit DAPI gefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen (Abb. 4.18). Während in normalen Interphasenkernen eine gleichmäßige DAPI-Färbung beobachtet wurde (nach Expression von MCPH1-FL, -Δe9-14 oder -Δe8), konnte man in PLCs (Expression von GFP allein oder von MCPH1Δe1-7) die Chromatinstruktur erkennen (Pfeile in Abb. 4.18). Alle transduzierten Zellen zeigten das grüne GFP-Signal, wodurch bestätigt wurde, dass diese Zellen tatsächlich die betreffende Isoform exprimierten.

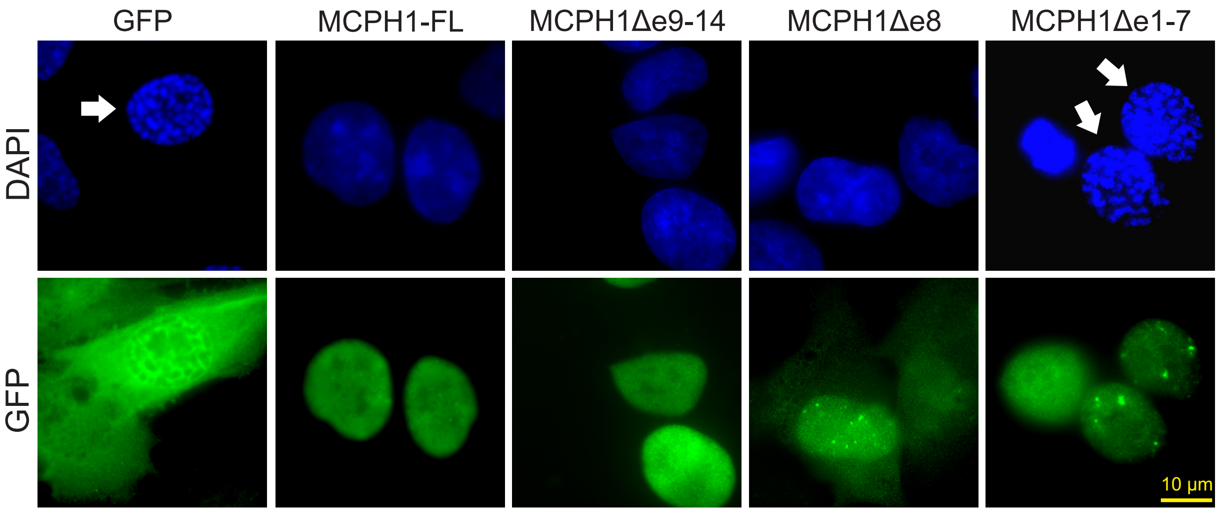


Abbildung 4.18 *Komplementation des zellulären PCC-Phänotyps in MCPH1-defizienten Fibroblastenlinie 562T. Immunfluoreszenzpräparate von 562T-Zellen, die mit GFP, GFP-MCPH1-FL, -Δe9-14, -Δe8 oder -Δe1-7 transduziert waren. GFP-Fluoreszenz (grün) bestätigt die Expression der transduzierten Konstrukte. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau): Korrigierte Zellen weisen eine homogene Kernfärbung auf. Die strukturierte DAPI-Färbung in manchen Zellen (Pfeile), die allein GFP oder GFP-MCPH1Δe1-7 exprimieren, ist kennzeichnend für ein Persistieren des PCC-Phänotyps.*

4.3 Intrazelluläre Lokalisation von MCPH1

4.3.1 Nachweis von MCPH1-Isoformen im Zellkern

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Komplementation mit MCPH1 und seinen Isoformen ist, dass alle MCPH1-Varianten Zellkern-spezifische Proteine exprimierten, wie die GFP-Signalverteilung in Immunfluoreszenzpräparaten zeigte (Abb. 4.18). Dagegen ließ sich in

562T-Zellen, die nur GFP exprimierten, Grünfluoreszenz sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma nachweisen. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden 562T-Zellen in Cytoplasma- und Kernanteile fraktioniert und Proteinextrakte aus diesen Fraktionen gewonnen, die mittels Western-Blot analysiert wurden (Abb. 4.19). Die Expression des GFP-Kontrollvektors zeigte eine ungefähr gleichmäßige Verteilung des GFP-Proteins auf beide Fraktionen. Dagegen waren alle GFP-MCPH1-Isoformen ausschließlich oder überwiegend im Zellkern nachweisbar. Diese Beobachtung war in Teilen überraschend, weil man für GFP-MCPH1Δe8 keine Zellkernlokalisierung erwarten würde, da die Abwesenheit von Exon 8 in dieser Variante zum Fehlen des kanonischen NLS-Motivs führt (vgl. Abb. 4.1C). Auch MCPH1Δe1-7 konnte im Zellkern detektiert werden. Dieses Ergebnis wiederum schließt aus, dass die Komplementationsuntauglichkeit dieser Deletionsvariante auf fehlenden Kerntransport zurückzuführen ist.

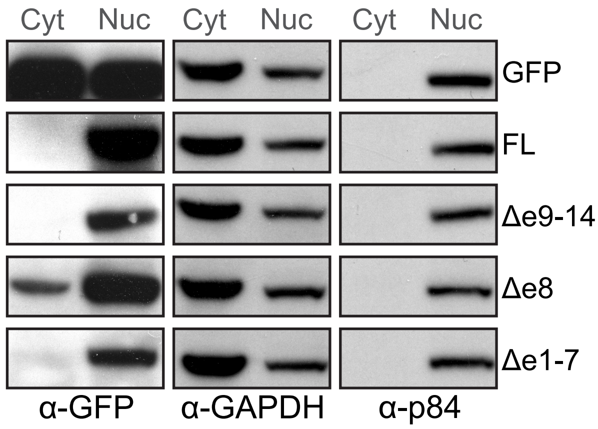


Abbildung 4.19 *Intrazelluläre Verteilung von ektopisch exprimierten GFP und GFP-MCPH1-Isoformen in transduzierten 562T-Zellen. Immunoblot aus Cytoplasma- (Cyt) und Zellkern-Proteinextrakten (Nuc) detektiert mit GFP-spezifischem Antikörper. GAPDH und das Kernmatrixprotein p84 wurden als Ladungskontrollen für die jeweilige Fraktion verwendet.*

4.3.2 Kernlokalisationsmotive in MCPH1

4.3.2.1 *In-silico*-Analyse

Die Beobachtung, dass GFP-MCPH1Δe8 in Zellkern transportiert wird, legte den Schluss nahe, dass Microcephalin weitere NLS-Motive besitzen könnte. Aus diesem Grund wurde die MCPH1-Proteinsequenz mit dem Programm *PSORT II* analysiert, mit der sich NLS eines Proteins anhand der Aminosäurensequenz vorhersagen lassen [87]. Dabei wurden insgesamt drei NLS-Motive aufgespürt, die nachfolgend als NLS1, NLS2 und NLS3 bezeichnet werden (Abb. 4.20). Bei NLS1 handelte es sich um eine Abfolge von fünf basischen Aminosäureresten KKKRK an Aminosäuren-Position 105-109 von MCPH1, die von *PSORT II* als NLS vom *pat4*-Typus klassifiziert wurde. Diese Art von NLS wurde erstmals bei dem großen T-Antigen des *SV40*-Viruses beschrieben und gehört zu den klassischen karyophilen Signalen [88]. Zu den klassischen NLS gehört auch NLS3 (PYSGKKK) an Aminosäuren-Position 799-805. Die von Exon 8 kodierte NLS2-Sequenz **KRKR**VSHGSHSPP**KE**K**C**KRKR dagegen gehört zur Gruppe der bipartiten NLS.

Diese Klasse wurde in dem Protein Nucleoplasmin des Krallenfroschartes *Xenopus laevis* entdeckt und ist durch zwei Cluster von basischen Aminosäuren (hier fett hervorgehoben) gekennzeichnet, die durch einen Spacer von 10 Aminosäureresten voneinander getrennt sind [89]. Die Positionen der NLS in MCPH1 relativ zu den BRCT-Domänen und in Bezug auf die Exon-Struktur verdeutlicht Abb. 4.20.

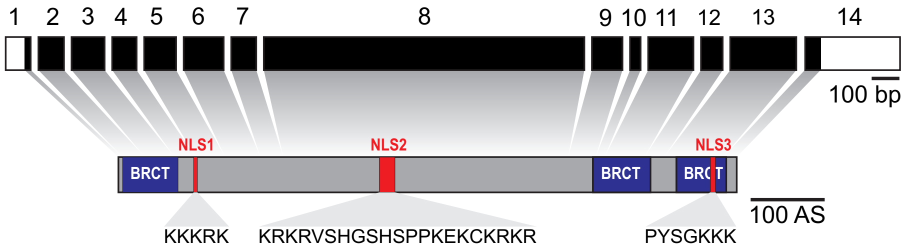


Abbildung 4.20 *NLS-Motive im MCPH1-Protein. Schematische Darstellung der MCPH1-cDNA (oben) und des MCPH1-Polypeptids (unten). Die Exons sind durch nummerierte Rechtecke dargestellt, die kodierende Region ist schwarz markiert. Die Positionen der NLS und der BRCT-Domänen sind durch rote bzw. blaue Vierecke gekennzeichnet. Die Aminosäuren-Sequenzen von NLS sind ebenfalls gezeigt.*

PSORT II kann neben NLS-Motiven auch die Wahrscheinlichkeit für die Kernlokalisation eines Proteins vorhersagen (Tab. 4.2). So wurde für MCPH1-FL eine Kernlokalisation mit 93 % Wahrscheinlichkeit angegeben. Für MCPH1Δe8 (ΔNLS2) war die Wahrscheinlichkeit auf 60,9 % reduziert. Für MCPH1-Proteine mit deletiertem NLS1 oder NLS3 wurde eine lediglich leicht geringere Kernlokalisationswahrscheinlichkeit vorhergesagt (82,6 % und 87 %) als für wt-MCPH1. Eine Elimination dieser NLS in Kombination mit NLS2 oder aller drei NLS bestätigte die geringe additive Wirkung eines Fehlens von NLS1 oder NLS3. Für das GFP-Protein, das keine NLS enthält, wurde erwartungsgemäß ein sehr niedriges Kernlokalisationspotenzial vorausgesagt (17,4 %).

Tabelle 4.2 *Auswirkungen von NLS-Deletionen auf die Kernlokalisation von MCPH1: In-silico-Prädiktion durch PSORT II und direkter Nachweis. Die Werte sind in Prozentzahlen angegeben.*

Protein	*in silico*	experimentell*
GFP-MCPH1	91,3	78,3 ±4,0
GFP-MCPH1ΔNLS1	82,6	81,4 ±2,8
GFP-MCPH1ΔNLS2	60,9	74,3 ±0,7
GFP-MCPH1ΔNLS3	87,0	67,5 ±2,8
GFP-MCPH1ΔNLS1/2	52,2	62,6 ±2,5
GFP-MCPH1ΔNLS1/3	78,3	62,3 ±1,7
GFP-MCPH1ΔNLS2/3	56,5	47,5 ±1,6
GFP-MCPH1ΔNLS1/2/3	47,8	41,3 ±3,2
GFP	17,4	43,7 ±1,4

*Densitometrisch bestimmte Stärke der Zellkernbande bezogen auf die Gesamtbandenstärke von Immunoblots nach Kern-Cytoplasma-Fraktionierung (vgl. Abb 4.22).

4.3.2.2 Funktionelle Untersuchung der NLS von MCPH1

Zur funktionellen Untersuchung der NLS-Motive von MCPH1 wurden *MCPH1*-Mutanten mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt (für Details s. Abschnitt 3.6.13) und in den Vektor pEGFP-N3 einkloniert, um EGFP-MCPH1-Fusionsproteine zu exprimieren. Die Deletionskonstrukte umfassten MCPH1-Varianten mit jeweils einer NLS-Deletion, mit paarweise fehlenden NLS bzw. ein Konstrukt, bei dem alle drei NLS-Sequenzen fehlten (vgl. Abb. 4.20). Mit den Konstrukten wurden HeLa-Zellen transfiziert. Mittels Immunfluoreszenz sowie Cytoplasma-Zellkern-Fraktionierung wurde die subzelluläre Lokalisierung des jeweiligen MCPH1-Typs untersucht. Immunfluoreszenz-Mikroskopie gestattete eine semiquantitative Analyse der Ergebnisse. So zeigten die Zellen, die wt-MCPH1 exprimierten, ein deutliches Zellkern-spezifisches GFP-Signal (Abb. 4.21). Im Gegensatz dazu nahm die GFP-Fluoreszenz in Kernen gegenüber Cytoplasma derjenigen Zellen deutlich ab, die MCPH1ΔNLS2/3 oder MCPH1ΔNLS1/2/3 exprimierten, ähnlich wie in Zellen mit der alleinigen GFP-Expression. Diese Ergebnisse stimmten grundsätzlich mit dem Voraussagen durch *PSORT II* überein (Tabelle 4.2), wobei NLS3 ein stärkeres Kernlokalisationspotential aufweist, als durch *PSORT II* vorhergesagt.

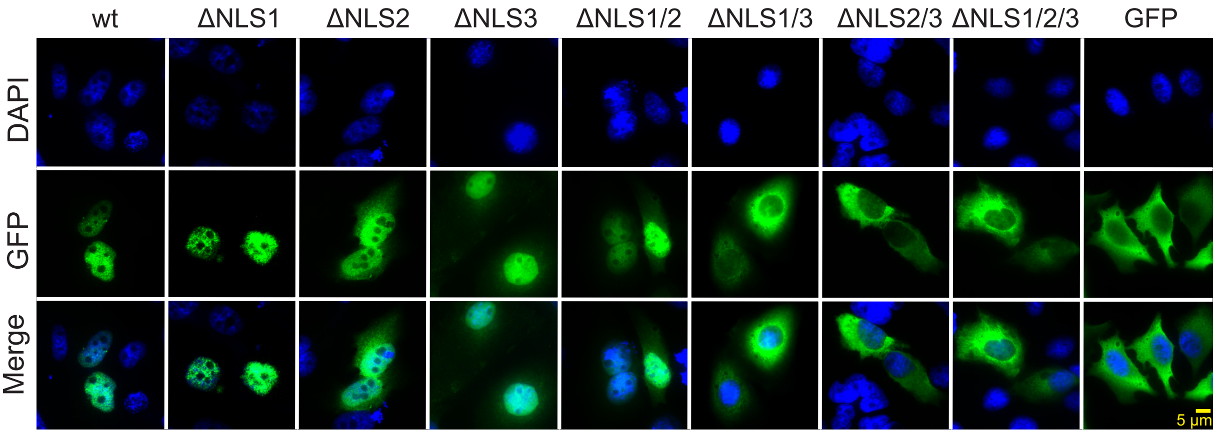


Abbildung 4.21 *Subzelluläre Verteilung von wt-MCPH1 und MCPH1 mit deletierten NLS nach Expression in HeLa-Zellen (Beschriftung oben). Die Expression von GFP diente als Kontrolle. Die GFP-MCPH1-Fusionproteine zeigten Grünfluoreszenz (obere Reihe). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (mittlere Reihe). Beide Fluoreszenzen wurden überlagert (untere Reihe).*

Eine Quantifizierung der subzellulären Verteilung des GFP-Signals ermöglichte die densitometrische Bestimmung der Banden-Stärke auf Immunoblots (Abb. 4.22). Vom Kontroll-Vektor pEGFP-N3 exprimiertes GFP wurde in ähnlichen Konzentrationen im Cytoplasma und im Zellkern nachgewiesen. Dagegen war das wt-MCPH1 zu 78 % im Zellkern zu finden. Während die Deletion von NLS1 bzw. NLS2 keinen signifikanten Einfluss auf die Kernlokalisation von GFP-MCPH1 hatte, wurde für GFP-MCPH1ΔNLS3 eine leichte Verringerung des GFP-Signals (68 %) im Zellkern beobachtet. Ein schwächeres Kern-spezifisches

GFP-Signal bewirkte auch die paarweise Ausschaltung der NLS-Motive 1/2 (63 %) bzw. 1/3 (62 %). Noch schwächere GFP-Signale im Kern traten beim Verlust von NLS2/3 bzw. aller drei NLS-Sequenzen auf. Die GFP-Signalverteilung dieser Varianten mit 48 % bzw. 41 % in der Kernfraktion war ähnlich wie in Zellen, die GFP allein exprimierten. Die Reinheit der cytoplasmatischen und der nukleären Proteinfraktionen wurde durch die Antikörper gegen das cytoplasmatische Protein GAPDH bzw. gegen das Kernmatrixprotein p84 überprüft. Ähnliche Ergebnisse wie in HeLa-Zellen wurden auch bei der Expression der gleichen Konstrukte in COS-7-Zellen beobachtet (hier nicht gezeigt).

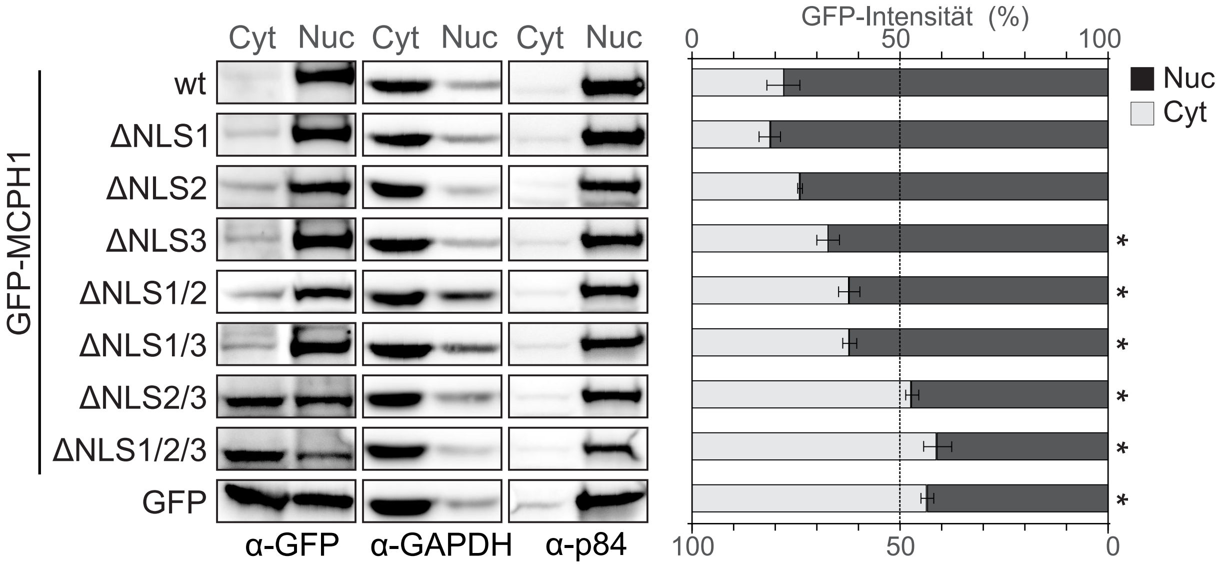


Abbildung 4.22 *Unterschiede in der Kern-Cytoplasma-Verteilung von wt-MCPH1 und MCPH1 mit verschiedenen Deletionen der drei NLS wie links beschriftet. Links: Immunoblots der Cytoplasma- (Cyt) und Kern- (Nuc) Proteinextrakte aus HeLa-Zellen, die transient GFP bzw. GFP-MCPH1-Deletionsvarianten exprimierten. Zur Detektion wurde ein GFP-Antikörper verwendet (Beschriftung unten). GAPDH und p84 dienten als Ladungskontrollen für die jeweilige Fraktion. Rechts: Densitometrische Quantifizierung der Verteilung des GFP-Signals zwischen Cytoplasma und Zellkern. Die Zahlen sind Mittelwerte aus drei Experimenten normalisiert gegen Ladungskontrollen. Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen wieder. * Signifikanz der Abnahme des GFP-Signals im Zellkern verglichen mit wt-MCPH1 mit $p < 0{,}05$ nach ANOVA.*

4.3.3 Negativer Nachweis von MCPH1-Isoformen in Centrosomen

Centrosomale Lokalisation wurde in der Literatur für das MCPH1-Protein des Huhns in DT40-Zellen sowie für humanes MCPH1 in der Zelllinie U2OS berichtet [90, 46]. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Beobachtung auch für menschliche Fibroblasten gilt und wie sich die MCPH1-Isoformen verhalten. Zu diesem Zweck wurden mit GFP-MCPH1 oder einer seiner Isoformen transduzierte MCPH1-defiziente 562T-Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie präpariert. Um Centrosomen sichtbar zu machen, wurden die Präparate mit einem γ-Tubulin-spezifischen Antikörper markiert, während MCPH1-Isoformen über den GFP-Tag nachgewiesen wurden. Abb. 4.23 zeigt, dass die γ-Tubulin- und die GFP-Fluoreszenzen in verschiedenen Ebenen focussierten, was einen Hinweis darauf lieferte, dass die GFP-Fluoreszenz von MCPH1 und seinen Isoformen im Zellkern allenfalls zufällig oder scheinbar mit der γ-Tubulin-Fluoreszenz von Centrosomen kolokalisierte. Weder für MCPH1-FL selbst noch für eine der MCPH1-Isoformen konnte eine Kolokalisierung mit γ-Tubulin beobachtet werden (Abb. 4.24A). Dagegen wurde eine eindeutige Kolokalisation der centrosomalen Proteinen Pericentrin und CDK5RAP2 (MCPH3) mit γ-Tubulin nachgewiesen (Abb. 4.24B, C), was als positive Kontrolle diente. Mittels confokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde bestätigt, dass keine der ektopisch exprimierten GFP-MCPH1-Isoformen mit Centrosomen assoziiert war (Abb. 4.25).

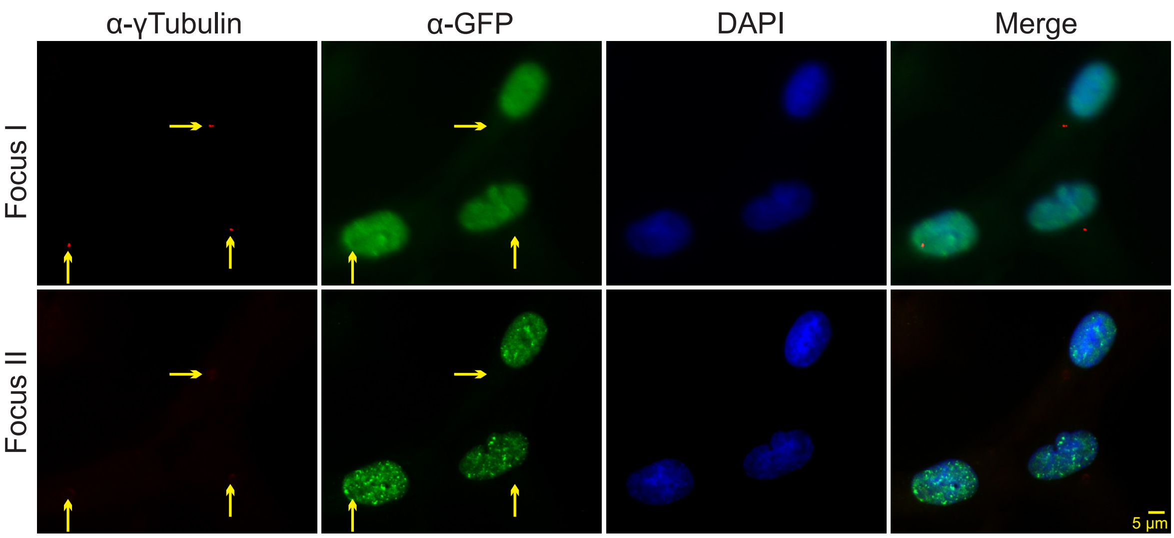


Abbildung 4.23 *Centrosomen und GFP-MCPH1 sind in verschiedenen Ebenen von 562T-Zellen lokalisiert. Dasselbe Präparat wurde auf γ-Tubulin (Focus I, rot) oder auf GFP-MCPH1 (Focus II, grün) focusiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und die Fluoreszenzsignale überlagert (Merge). Gelbe Pfeile markieren die Lage der Centrosomen. In Focus I ist GFP- und DAPI-Signale unscharf, während in Focus II die γ-Tubulin-Signale der Centrosomen kaum sichtbar sind.*

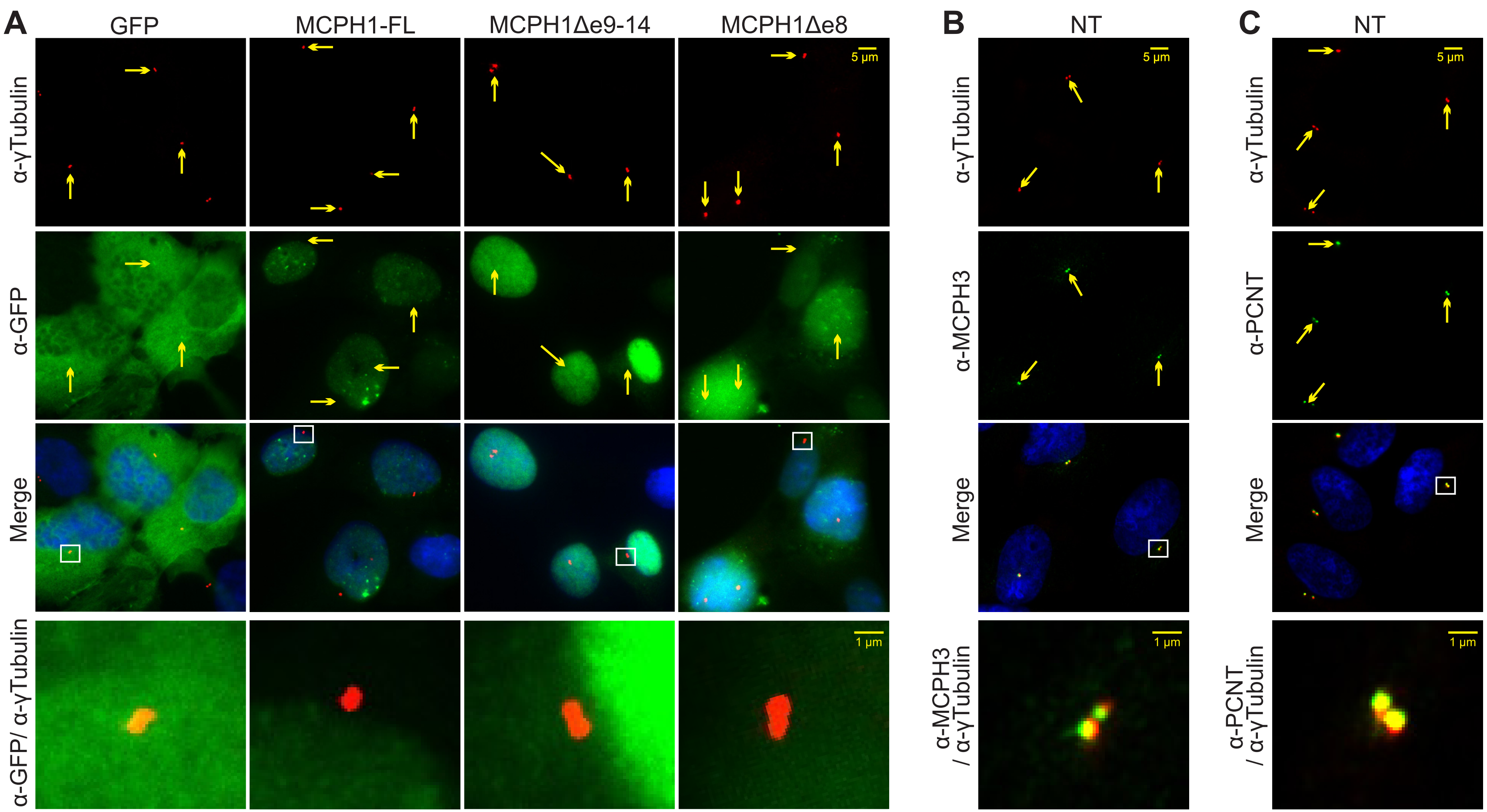


Abbildung 4.24 *Fehlende Kolokalisation von GFP-MCPH1-Fusionsproteinen mit Centrosomen in 562T-Fibroblasten.* ***A****. Doppelimmunfluoreszenzpräparate mit α-γTubulin (rot) und α-GFP (grün). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die gelben Pfeile weisen auf Centrosomen hin. Weiße Rahmen markieren Bereiche, die in Detailansicht in der untersten Reihe dargestellt sind. Die Aufnahmen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv durchgeführt. In* ***B*** *und* ***C*** *ist die positive Kolokalisation von CDK5RAP2 (MCPH3, grün) und Pericentrin (PCNT, grün) mit γTubulin (rot) in Centrosomen von nicht-transduzierten (NT) 562T-Zellen gezeigt.*

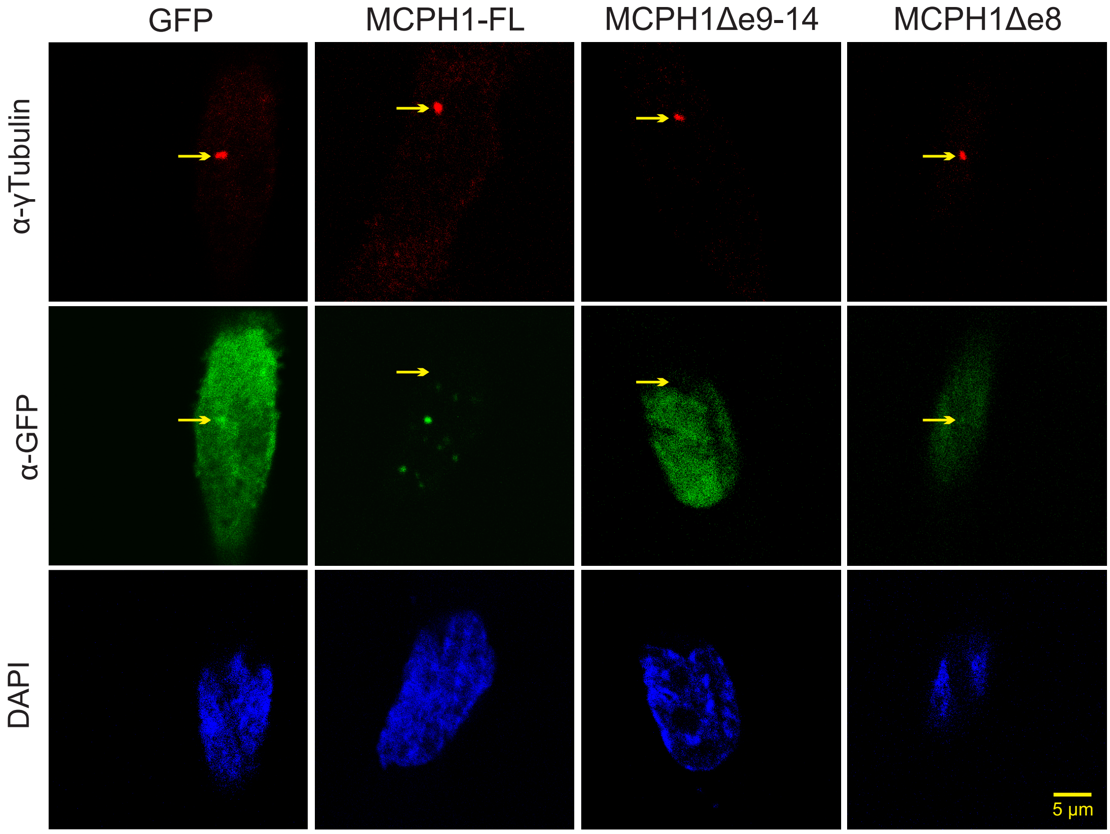


Abbildung 4.25 *Fehlende Kolokalisation von γ-Tubulin (rot) mit ektopisch exprimierten GFP-MCPH1-Fusionsproteinen (grün) in HeLa-Zellen. Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt (blau). Dargestellt sind jeweils gleiche Ebenen einer Untersuchung am confokalen Fluoreszenzmikroskop. Gelbe Pfeile markieren die Lage von Centrosomen. Die scheinbare Kolokalisation von Grünfluoreszenz mit γ-Tubulin in GFP-exprimierenden Zellen resultiert aus einer Überexpression des GF-Proteins in diesen Zellen.*

Um die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen und der Studie von Tibelius et al. [46] zu erklären, wurde der in jener Arbeit verwendete MCPH1-Antikörper (als CCU.M1 bezeichnet) für einen Immunoblot mit Proteinextrakten aus 562T-Zellen eingesetzt, die MCPH1-FL bzw. seine Isoformen exprimierten. In allen Proben waren Banden bei über 250 kDa und ca. 100 kDa nachweisbar (Abb. 4.26A). Es konnte kein Unterschied zwischen Proteinextrakten aus nicht-transduzierten und transduzierten Zellen festgestellt werden. MCPH1-Isoform-spezifische Banden waren allerdings nach Inkubation mit α-GFP-Antikörper detektierbar. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die GFP-Fusion das Erkennungsepitop des CCU.M1-Antikörpers maskiert, welches am N-terminalen Ende des Microcephalins liegt [46], und der Antikörper dann unspezifisch an andere Proteine bindet.

Ein Centrosomen-spezifisches Signal in Immunfluoreszenzpräparaten konnte mit dem Antikörper von Tibelius et al. [46] bei eigenen Untersuchungen in HeLa- oder U2OS-Zellen nicht beobachtet werden (Abb. 4.26B). Das Antigen, das von diesem Antikörper erkannt

wurde, schien flächig im Cytoplasma verteilt zu sein. Das widerspricht einer centrosomalen Lokalisation des nachgewiesenen Antigens ebenso wie den in der hier vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnissen einer überwiegenden Zellkernlokalisierung aller MCPH1-Isoformen. Damit bleibt die Frage offen, ob das von dem CCU.M1-Antikörper erkannte Antigen eine weitere MCPH1-Isoform darstellt, oder ob es sich um ein völlig anderes Protein handelt.

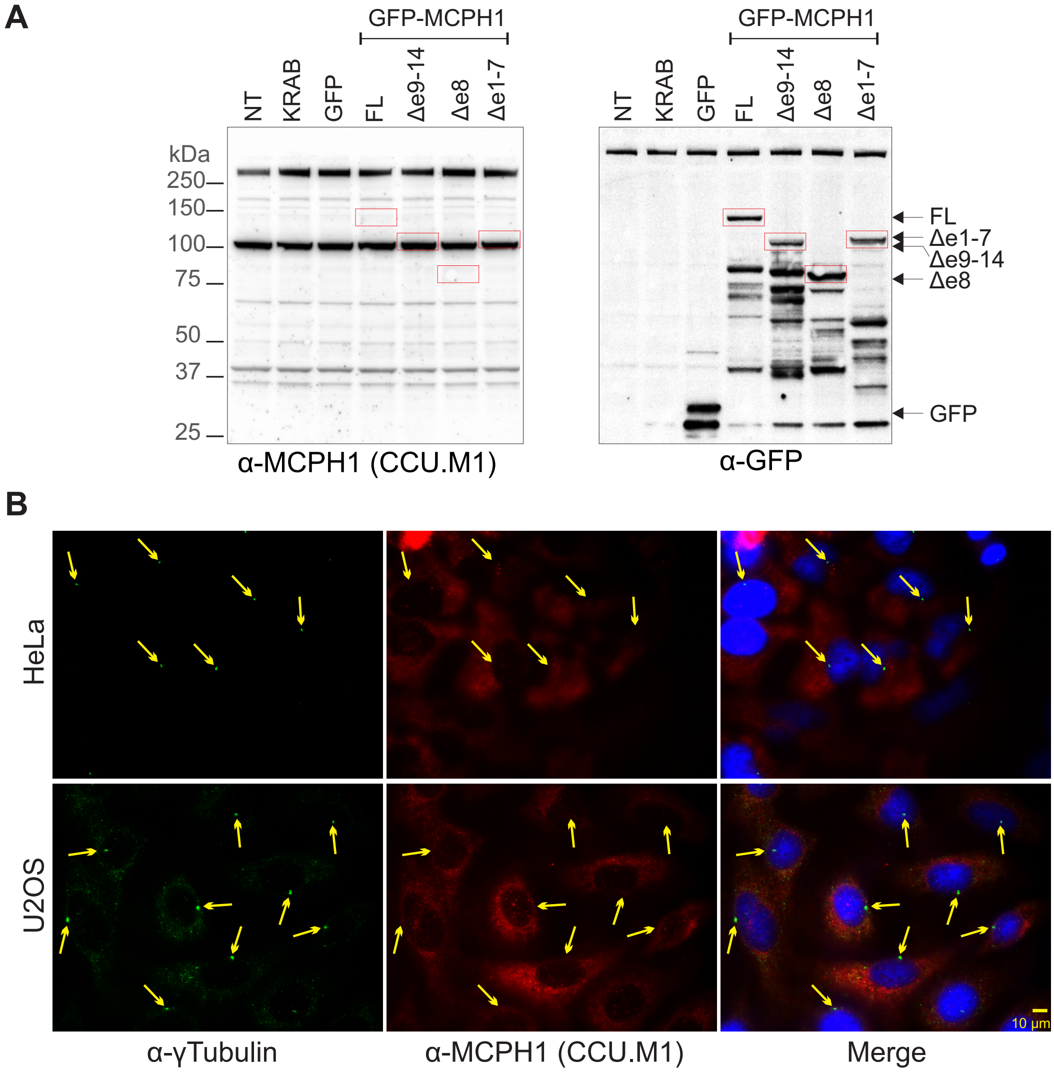


Abbildung 4.26 *Eingeschränkte MCPH1-Spezifität des Antikörpers CCU.M1 aus der Studie von* TIBELIUS *et al. [46].* ***A****. Immunoblot mit Proteinextrakten aus 562T-Fibroblasten mit ektopischer Expression von GFP-MCPH1-FL bzw. der Varianten Δe9-14, Δe8 oder Δe1-7 (GFP und KRAB sind Kontrollen; NT bezeichnet nicht transduzierte Zellen). Während CCU.M1 in allen Extrakten zwei Banden von ca. 100 und 250 kDa erkennt (links), sind mit α-GFP-Antikörper nur in MCPH1-exprimierenden Zellen jeweils Banden entsprechend der Größe von FL oder seiner Isoformen nachweisbar. Diese sind auf dem GFP-Blot (rechts) mit roten Rechtecken gekennzeichnet und auf den CCU.M1-Blot (links) projeziert.* ***B****. Immunfluoreszenzpräparate von HeLa- (obere Reihe) und U2OS-Zellen (untere Reihe) mit γTubulin- (grün) oder CCU.M1-Nachweis (rot). Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt (blau). Pfeile weisen auf Centrosomen hin. Man beachte die ausgedehnte cytoplasmatische Lokalisation des Antigens, das von CCU.M1 erkannt wird.*

4.3.4 Nachweis von MCPH1 in Kernfoci

Eine Minderheit von 562T- und HeLa-Zellen, die GFP-MCPH1-FL bzw. eine der Isoformen Δe8 oder Δe1-7 exprimierten, zeigte eine besondere Verteilung des entsprechenden Fusionsproteins im Zellkern. So wiesen 10,8 % der Zellen mit GFP-MCPH1-FL-Expression, 4,8 % der Zellen mit Expression von GFP-MCPH1Δe8 und 5,8 % der Zellen mit Expression von GFP-MCPH1Δe1-7 eine fokale nukleäre Organisation der Proteine auf. Dagegen war GFP-MCPH1Δe9-14 in allen exprimierenden Zellen eher homogen im Zellkern verteilt. Diese Beobachtung legt eine Beteiligung des C-Terminus von MCPH1 an der Möglichkeit der beschriebenen Verteilung nahe. Eine ähnliche Verteilung wurde für das Promyelocytic-Leukemia-Protein (PML) beschrieben, das einer der Hauptkomponenten von sogenannten *nuclear bodies* (NBs) ist [91]. Um die Möglichkeit zu untersuchen, dass MCPH1 ebenfalls Bestandteil von NBs ist, wurden mit GFP-MCPH1 oder einer seiner Isoformen transduzierte MCPH1-defiziente 562T-Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie präpariert. Um NBs sichtbar zu machen, wurden die Präparate mit einem PML-spezifischen Antikörper markiert, während MCPH1-Isoformen über den GFP-Tag detektiert wurden. Weder für MCPH1-FL noch für eine der MCPH1-Isoformen konnte eine Kolokalisation mit PML-NBs nachgewiesen werden (Abb. 4.27). Damit wurde ausgeschlossen, dass MCPH1 mit NBs direkt assoziiert ist.

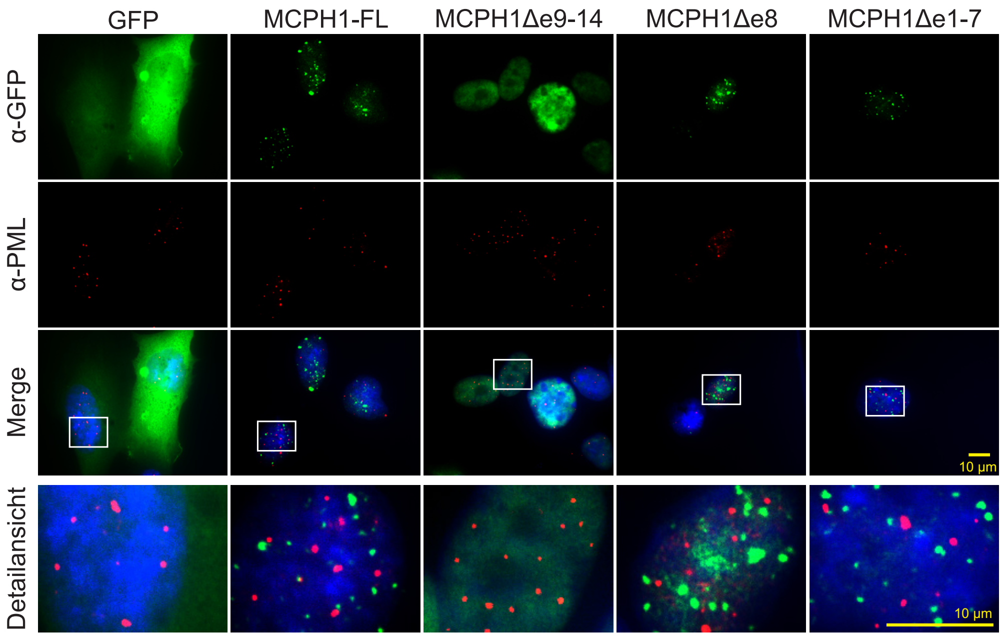


Abbildung 4.27 *Fehlende Kolokalisation von MCPH1 und seiner Isoformen mit Nuclear-Bodies. Immunfluoreszenzpräparate aus 562T-Fibroblasten mit ektopischer Expression der GFP-MCPH1-Isoformen. Die GFP-Fusionsproteine sind mit α-GFP-Antikörper (grün) markiert. Nuclear-Bodies wurden mit α-PML-Antikörper sichtbar gemacht (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt (blau). Weiße Rahmen markieren Bereiche, die in Detailansicht in der untersten Reihe dargestellt sind: Keine der MCPH1-Isoformen kolokalisiert mit Nuclear-Bodies.*

4.4 MCPH1 und DNA-Reparatur

4.4.1 Kolokalisation von MCPH1-Isoformen mit γH2AX in Kernfoci

Es wurde bereits mehrfach über die Beteiligung von MCPH1 an der Erkennung der DNA-Doppelstrangbrüche berichtet. Bestimmte DNA-Läsionen können als sogenannte nukleäre Foci in Immunfluoreszenzpräparaten sichtbar gemacht werden. Dies geschieht über den Nachweis an den Schadensort aggregierter Signal- oder Reparaturproteine. Ein wichtiger Bestandteil solcher Reparatur-Foci ist die phosphorylierte Form vom Histon H2AX (γH2AX) [92]. Um festzustellen, welche der Isoformen von MCPH1 in DNA-Schadensantwort involviert sind, wurde die Kolokalisation von GFP-MCPH1-Isoformen mit γH2AX nach Induktion von DNA-Schäden durch ionisierende Bestrahlung untersucht. Dazu wurden GFP-MCPH1-transduzierte 562T-Zellen 2 h nach der Bestrahlung (10 Gy) fixiert und für Immunfluoreszenzmikroskopie mit Antikörpern gegen GFP sowie γH2AX inkubiert.

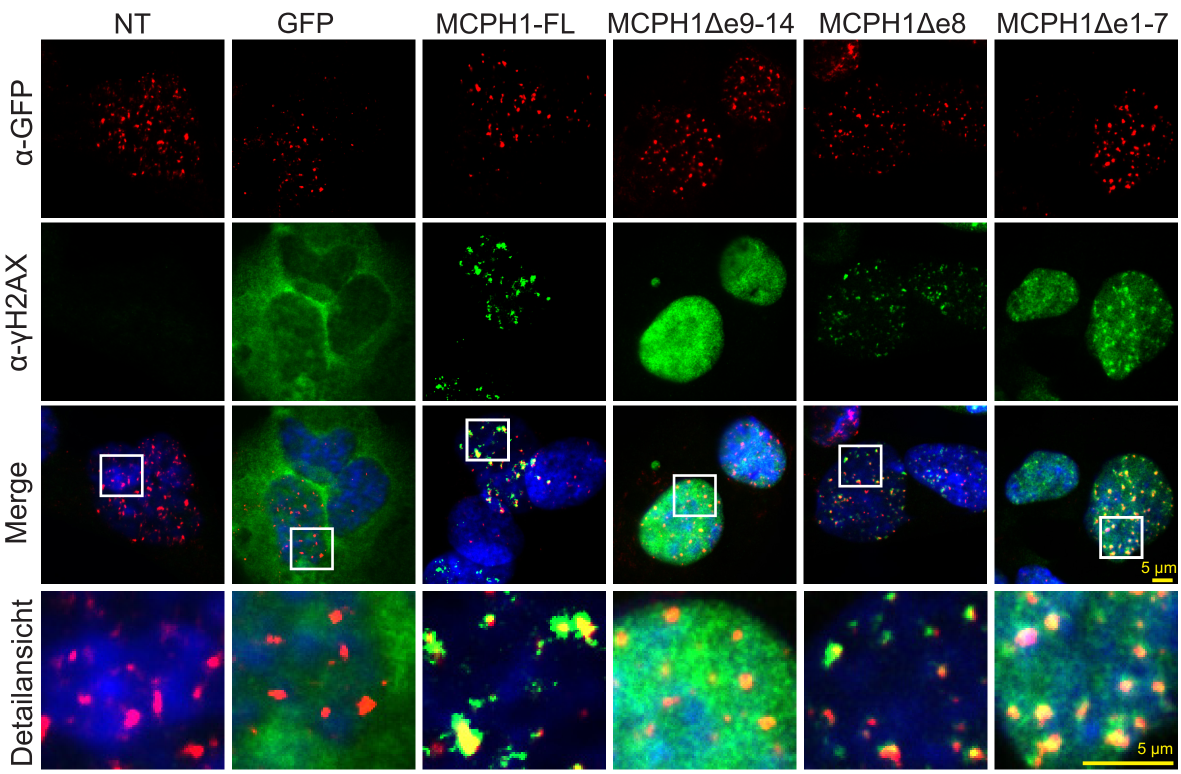


Abbildung 4.28 *Kolokalisation von MCPH1 mit γH2AX in Strahlen-induzierten Kernfoci. Nicht-transduzierte 562T-Zellen (NT) und 562T-Zellen, die GFP allein oder GFP-MCPH1-Isoformen exprimieren (Beschriftung oben), wurden 2 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy fixiert und mit Antikörpern gegen GFP-Tag (grün) und γH2AX (rot) markiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Weiße Rahmen markieren Bereiche, die in Detailansicht in der untersten Reihe dargestellt sind.*

Wie Abb. 4.28 zeigt, wurden in allen Proben γH2AX-Foci gebildet. In nicht transduzierten Zellen sowie in Zellen, die GFP allein exprimierten, lag der Anteil der Zellen mit γH2AX-Foci bei 36 % bzw. 40 %. Demgegenüber war die Rate γH2AX-Foci-positiver Zellen in Zelllinien, die GFP-MCPH1-FL (49 %), -Δe9-14 (60 %) bzw. -Δe8 (62 %) exprimierten, höher. Offensichtlich ist MCPH1 für die Bildung von γH2AX-Foci nicht notwendig. Allerdings scheint die Expression von MCPH1-FL, -Δe9-14 oder -Δe8 zu einer Stabilisierung von γH2AX-Foci zu führen. Dafür scheint der N-Terminus von MCPH1 eine Rolle zu spielen, da bei Expression der Deletionsvariante MCPH1Δe1-7 kein Anstieg des Prozentsatzes von Zellen mit γH2AX-Foci (37,5 %) beobachtet wurde.

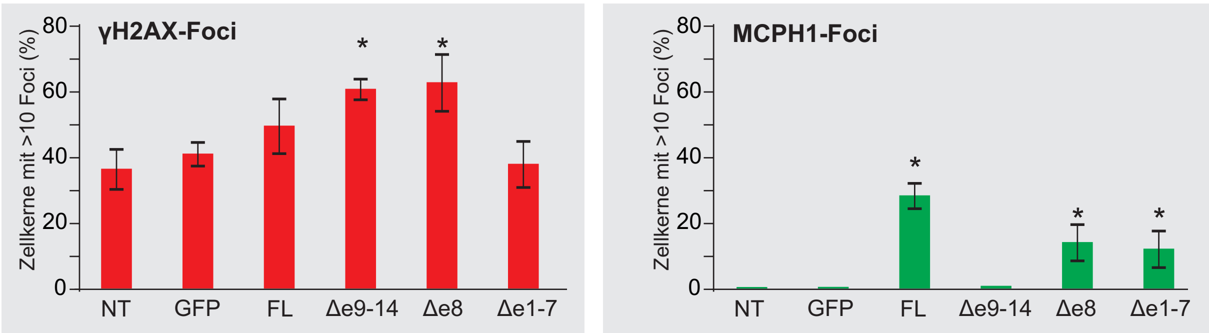


Abbildung 4.29 *Quantifizierung von Zellen mit γH2AX-Foci (links) und/oder MCPH1-Foci (rechts) in 562T-Zellkulturen aus dem in Abb. 4.28 gezeigten Experiment. Fehlerindikatoren zeigen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Zählungen von jeweils ca. 300 Zellkernen. * $p \leq 0{,}05$ vs. NT; ANOVA.*

MCPH1-Foci wurden nur in Zellen beobachtet, die GFP-MCPH1-FL, -Δe8 oder -Δe1-7 exprimierten, d.h. bei der Expression von Varianten mit dem C-terminalen BRCT-Tandem (Abb. 4.28). Dabei war der Anteil der Zellen mit MCPH1-Foci bei der Expression von MCPH1-FL höher (30 %) als dies bei Expression von -Δe8 (14 %) oder -Δe1-7 (12 %) beobachtet wurde. Während in nicht transduzierten Zellen kein GFP-Signal nachweisbar war, war ein solches in GFP- bzw. GFP-MCPH1Δe9-14-exprimierenden Zellen gleichmäßig im Zellkern verteilt. Die quantitativen Ergebnisse sind in Diagrammen in der Abb. 4.29 zusammengefasst. Offensichtlich ist die C-terminale Region von MCPH1 für die Bildung von MCPH1-Foci unentbehrlich. Der Rest des Proteins scheint einen Beitrag zu diesem Prozess zu leisten. Die Fähigkeit von Zellen zur Bildung induzierter MCPH1-Foci folgte damit ihrer Tendenz zur spontanen fokalen nukleären Verteilung von MCPH1 bei ektopischer Expression von GFP-MCPH1-FL bzw. der Varianten Δe8 oder Δe1-7.

4.4.2 G2/M-Checkpoint in U2OS-Zellen nach MCPH1-*knockdown*

Es wurde berichtet, dass eine Herunterregulation von MCPH1 mittels RNA-Interferenz zu einer Beeinträchtigung des Doppelstrangbruch-induzierten G2/M-Checkpoints führt [93]. In jener und in folgenden Studien [38, 39] wurden für das *knockdown* siRNA-Sequenzen verwendet, die komplementär zu Exon 5 bzw. Exon 8 von *MCPH1* waren. Dadurch wurde die Expression der beiden MCPH1-Hauptisoformen (FL und Δe9-14) gleichzeitig herunterreguliert. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen untersucht, welche Auswirkung die Ausschaltung jeder einzelnen dieser Isoformen auf den G2/M-Checkpoint hat. Diese und die weiteren in diesem Abschnitt beschriebenen Studien wurden in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. H. Neitzel und Herrn Dr. M. Trimborn (Charité-Universitätsmedizin Berlin) realisiert. Dabei wurden die Transfektionen von Zellen mit siRNA und die DNA-Schadensinduktionen in Berlin durchgeführt, während die Färbungen der fixierten Proben, die durchflusszytometrischen Messungen und die Auswertung der Messdaten im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Würzburg erfolgten.

Die Untersuchung der G2/M-Checkpoint-vermittelten Zellzyklus-Arretierung fand anhand der Analyse des Anteils von mitotischen Zellen statt. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 (H3P) gefärbt. Histon H3 wird in der Prophase der Mitose an Position Serin 10 phosphoryliert und nach Abschluss der Zellteilung wieder dephosphoryliert [94]. Es dient daher als mitotischer Marker. Gleichzeitig wurde ein Zellzyklusprofil der Zellpopulation durch Färbung mit DAPI erstellt.

Zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde das Radiomimetikum Bleomycin verwendet [92]. Zunächst wurden die geeignete Konzentration dieser Substanz und die Einwirkungsdauer bestimmt, die zur Erzielung einer effektiven G2/M-Checkpoint-Arretierung von Zellen notwendig waren. Dazu wurden U2OS-Zellen 2 h oder 4 h lang mit 10, 50 oder 100 µg/ml Bleomycin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und für die durchflusszytometrische Messung mit H3P-Antikörper präpariert. Wie in Abb. 4.30 zu sehen ist, war nach 2 h Exposition gegenüber der Substanz der Rückgang des Anteils H3P-positiver Zellen proportional zu der Bleomycin-Konzentration. Statistische Signifikanz erreichte diese Abnahme jedoch nur in Proben, die mit 100 µg/ml Bleomycin behandelt worden waren ($p = 0{,}008$, ANOVA). Nach 4 h Exposition gegenüber der Substanz wurde in allen drei Proben eine statistisch signifikante G2/M-Arretierung erreicht ($p < 0{,}017$), wobei die Zellen, die mit 10 µg/ml Bleomycin behandelt worden waren, eine weniger starke Abnahme (69 %) als die Zellen zeigten, die 50 oder 100 µg/ml ausgesetzt waren (> 90 % Abnahme). Für die folgenden Experimente wurde zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen eine Konzentration von 100 µg/ml Bleomycin verwendet.

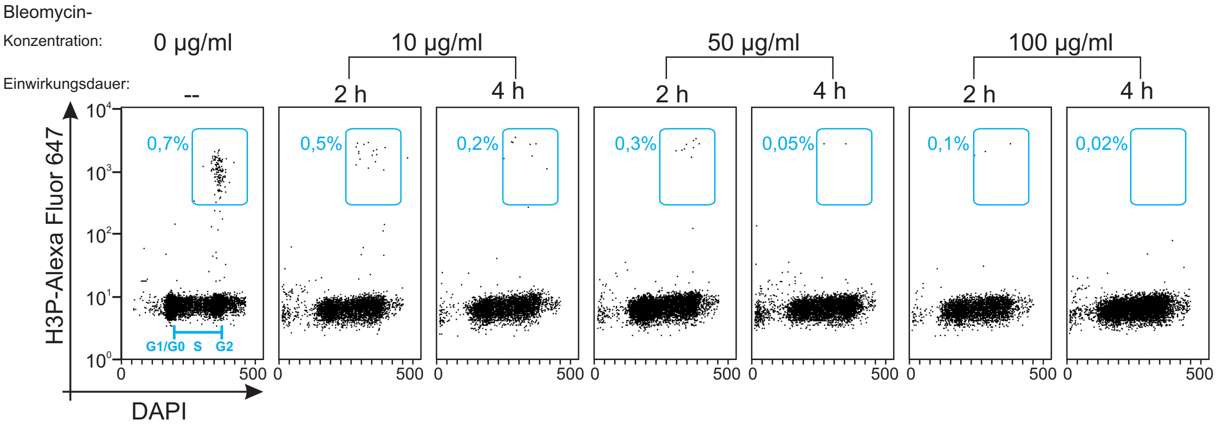


Abbildung 4.30 *Bestimmung der geeigneten Bleomycin-Konzentration und -Einwirkungsdauer zur Induktion von G2/M-Checkpoint-Arretierung von U2OS-Zellen. Durchflusszytometrische Zellzyklusprofile mit Bleomycin behandelter U2OS-Zellen wie angegeben. Jeder Punkt in Diagrammen entspricht einer Zelle mit unterschiedlichem DNA- (Abszisse) und H3P-Gehalt (Ordinate). Blaue Rechtecke umrahmen die mitotischen Zellen mit der Angabe deren Prozentanteils.*

Um *MCPH1-FL* herunter zu regulieren, wurde Exon-12-spezifische siRNA (FL-siRNA) verwendet, während siRNA gegen die 3'-UTR von *MCPH1Δe9-14* (Δe9-14-siRNA) die Konzentration dieser Isoform individuell vermindern sollte. siRNA gegen Exon 7 (Ex7-siRNA) sollte die Konzentrationen beider Isoformen reduzieren. Um einen Vergleich mit den publizierten Ergebnissen von Xu et al. [93] zu ermöglichen, wurden die in jener Studie verwendeten siRNA-Sequenzen ebenfalls eingesetzt. Sie wurden als Xu1-siRNA (Exon 5) bzw. Xu2-siRNA (Exon 8) bezeichnet. Als Kontrolle wurde eine unspezifische siRNA (Ctrl) verwendet. Transfektionsansatz ohne siRNA (Mock) diente als Kontrolle für mögliche Auswirkungen der Transfektionsprozedur.

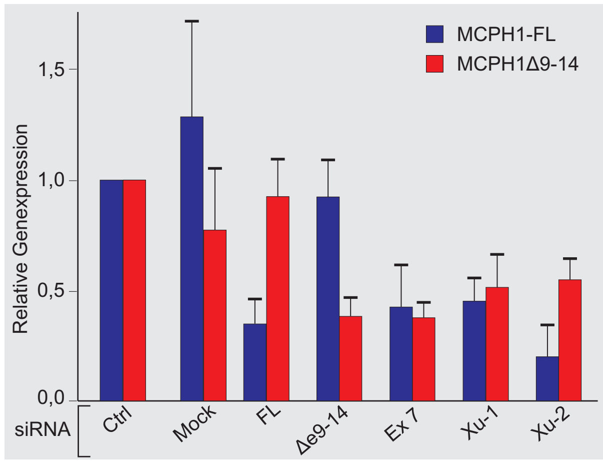


Abbildung 4.31 *Relative Expression (in Relation zur Kontrollgruppe Ctrl) von MCPH1-FL (blaue Säulen) und MCPH1Δe9-14 (rote Säulen) in U2OS-Zellen nach RNA-Interferenz mittels siRNAs wie angegeben (Ctrl: unspezifische Kontroll-siRNA; Mock: Kontrolltransfektion ohne siRNA). Die Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei Experimenten dar.*

Die Effektivität der siRNA-Behandlung wurde anhand Quantifizierung der Expression von *MCPH1-FL* und *MCPH1Δe9-14* mittels einer qPCR überprüft. Wie das Diagramm in Abb. 4.31 zeigt, nahm die Expression der beiden MCPH1-Isoformen in Zellen, die mit Ex7-, Xu1- oder Xu2-siRNA behandelt worden waren, um mindestens 60 % ab verglichen mit Zellen, die

mit Kontroll-siRNA transfiziert waren. Demgegenüber zeigten U2OS-Zellen, die mit FL- oder Δe9-14-siRNA behandelt worden waren, eine verminderte Expression eines jeweils der beiden MCPH1-Varianten, womit die Spezifität der siRNA-Sequenzen bestätigt wird. Mock-transfizierten Zellen zeigten ähnliche Höhe der MCPH1-Expression wie der Kontrollansatz mit Ctrl-siRNA.

Nach siRNA-Behandlung wurden U2OS-Zellen mit 100 µg/ml Bleomycin 2 h lang inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und für die Durchflusszytometrie präpariert. Die H3P-Bestimmung zeigte, dass in allen Proben der Anteil der mitotischen Zellen um mindestens 78 % abnahm (Abb. 4.32A). Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollansatz mit unspezifischer siRNA (Abnahme 88 %) und MCPH1-spezifischen siRNAs (Abnahme 80 – 92,5 %) war nicht feststellbar ($p \geq 0{,}250$, ANOVA) . Damit konnte das Ergebnis von Xu et al. [93] eines beeinträchtigten G2/M-Checkpoints bei MCPH1-Depletion nicht bestätigt werden. Zwar zeigten die Zellen, die mit Xu1-siRNA transfiziert waren, einen höheren H3P-positiven Anteil (0,23 %) nach Bleomycin-Behandlung als die Zellen des Kontrollansatzes (0,05 %), war allerdings der Anteil der mitotischen Zellen vor der Bleomycin-Behandlung in dieser Probe ebenfalls höher (1,2 % vs. 0,4 %, Abb. 4.32B). Höhere Anteile H3P-positiver Zellen wurden auch in anderen U2OS-Zellkulturen ohne Bleomycin-Exposition beobachtet, wenn MCPH1-FL allein oder beide MCPH1-Isoformen gleichzeitig ausgeschaltet wurden, wie die Ansätze mit FL-siRNA (0,6 %), Ex7-siRNA (0,8 %) und Xu2-siRNA (1 %) zeigen.

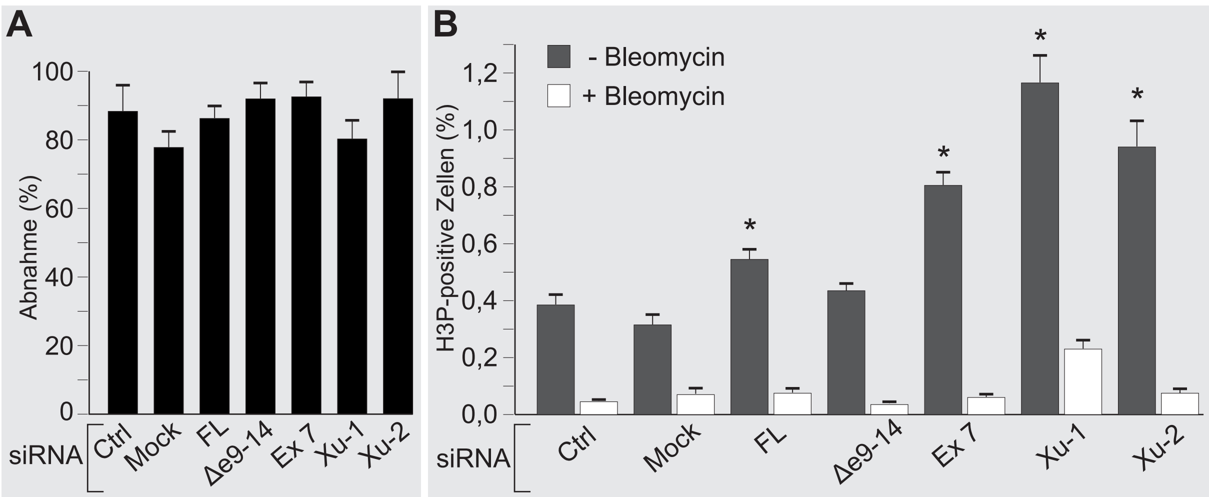


Abbildung 4.32 *DNA-Doppelstrangbruch-induzierte G2/M-Checkpoint-Arretierung von U2OS-Zellen nach MCPH1-knockdown mittels siRNAs wie angegeben (Ctrl: unspezifische Kontroll-siRNA; Mock: Kontrolltransfektion ohne siRNA).* ***A****. Relativer Rückgang der mitotischen Zellen nach Bleomycin-Behandlung* ***B****. Anteil der mitotischen Zellen vor und nach der Bleomycin-Behandlung (durchflusszytometrische Analyse mittels H3P- und DAPI-Färbung). Die Säulen geben Mittelwerte von drei Messungen an, die Fehlerbalken Standardabweichungen.*
** $p < 0{,}05$ vs. Ctrl; ANOVA.*

Der Anstieg des Anteils mitotischer (H3P-positiver) Zellen nach Herunterregulation aller *MCPH1*-Transkriptformen beruhte nicht auf generellen Zellzyklusverschiebungen (Abb. 4.33). Insbesondere waren die S-Phase-Anteile als ein Maß für die Gesamtzellproliferation nicht systematisch unterschiedlich zwischen den verschiedenen Kulturen. Es fand sich keine Korrelation zwischen den Anteilen der S-Phase- und der H3P-positiven Zellen. Mittels einer statistischen Analyse nach *Pearson-Korrelation* konnte ein Korrelationskoeffizent von nur -0,0447 ermittelt werden[3].

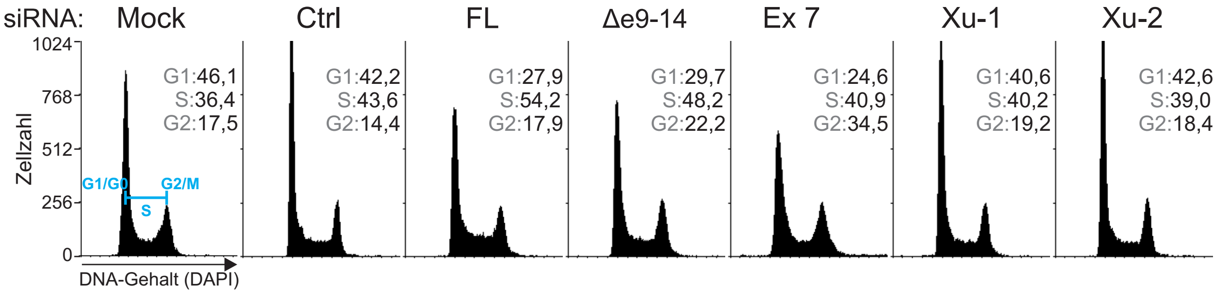


Abbildung 4.33 *Zellzyklusverteilungen von U2OS-Zellen nach RNA-Interferenz mittels siRNAs wie angegeben. (Ctrl: unspezifische Kontroll-siRNA; Mock: Kontrolltransfektion ohne siRNA). Durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehalts mittels DAPI-Färbung. Prozentuale Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen (ermittelt mit dem Programm Cylchred) sind auch angegeben.*

Woher die größeren Anteile mitotischer Zellen in U2OS-Kulturen nach Herunterregulation aller MCPH1-Transkriptformen resultierte, blieb letztlich unklar. Diese Phänomen wurde aber als nicht entscheidend für die Beantwortung der eigentlichen Fragestellung angesehen. Als wichtiges Ergebnis der Untersuchungen ergab sich eine intakte G2/M-Checkpoint-Funktion nach DNA-Doppelstrangbruch-Induktion bei RNA-Interferenz gegenüber einzelnen und allen Transkriptformen von *MCPH1*.

4.4.3 Mitose-Index in MCPH1-defizienten Zelllinien

Die Herunterregulation der Expression eines Gens mittels siRNA stellt einerseits eine hilfreiche Methode zur Untersuchung der Funktionen des betreffenden Gens dar, anderseits aber können sogenannte *Off-target*-Effekte auftreten, wenn die verwendete siRNA unspezifisch andere, für die Untersuchung kritische Gen-Produkte beeinflusst [95]. Da solche technisch bedingten Nebeneffekte in Zellen mit konstitutionellen Gendefekten nicht auftreten können, stellen sie ein System von größerer physiologischer Relevanz dar.

[3]Bei einem Wert von +1 (bzw. −1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die beiden Merkmale überhaupt nicht linear voneinander ab.

Um zu überprüfen, ob konstitutionelle MCPH1-Defizienz einen Einfluss auf Mitose-Index in betroffenen Zellen hat, wurden B-LCLs von drei Patienten mit den homozygoten *MCPH1*-Mutationen c.80C>G (p.T27R), c.427dupA (p.T143NfsX5) bzw. c.74C>G (p.S25X) mit drei Kontroll-B-LCLs (K1 – K3) mit Wildtyp-*MCPH1* in den Anteilen mitotischer (H3P-positiver) Zellen verglichen. Die durchflusszytometrische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied in der Mitose-Rate zwischen den MCPH1-defizienten (1,3 – 1,7 %) und den Kontrollzelllinien (1,2 – 1,6 %) wie Abb. 4.34A zeigt. Ebenfalls kein signifikanter Unterschied wurde zwischen MCPH1-defizienten 562T-Fibroblasten (mit der homozygoten *MCPH1*-Mutation c.427dupA) und transduzierten 562T-Fibroblasten beobachtet, die ektopisch MCPH1-FL bzw. die MCPH1-Isoformen Δe9-14, Δe8 oder Δe1-7 exprimierten. Wie das Balkendiagramm in Abb. 4.34B zeigt, waren die Anteile H3P-positiver Zellen in den MCPH1-substituierten 562T-Zellen vergleichbar hoch wie in 562T, die das Regulationsprotein tTR-KRAB bzw. GFP allein exprimierten.

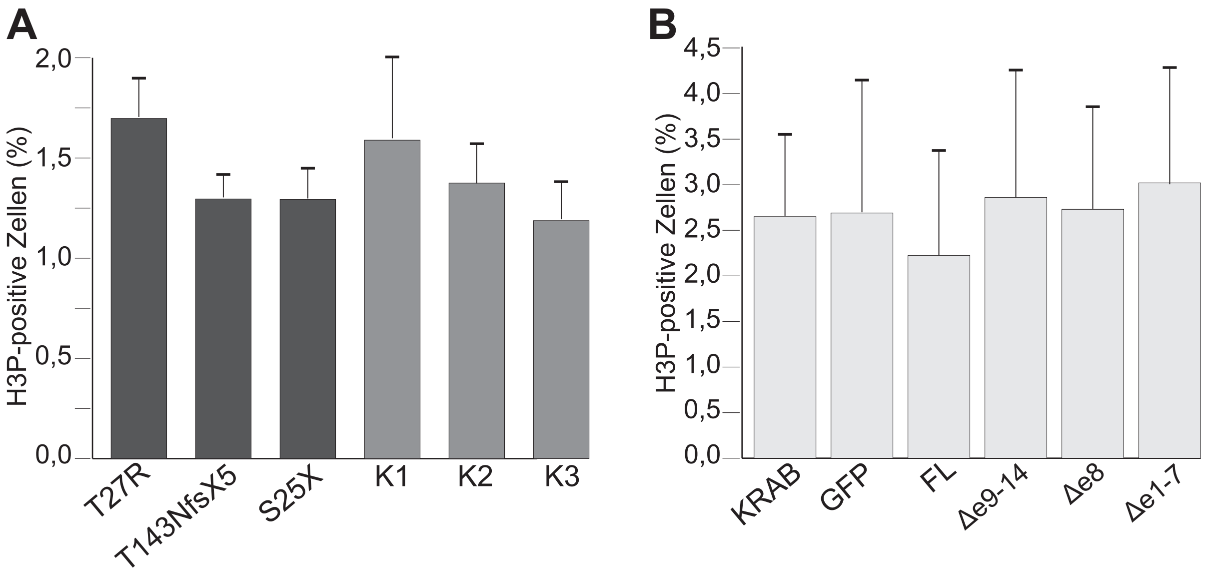


Abbildung 4.34 *Fehlende Beeinflussung des Mitose-Indexes durch MCPH1-Defizienz.* ***A.*** *B-LCLs mit den angegebenen homozygoten MCPH1-Mutationen zeigen vergleichbare Anteile H3P-positiver Zellen wie normale Kontrollen (K1 – K3).* ***B.*** *Nicht komplementierte (KRAB, GFP) und MCPH1-komplementierte 562T-Fibroblasten (FL, Δe9-14, Δe8, Δe1-7) mit der homozygoten MCPH1-Mutation T143NfsX5 weisen ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede der Anteile mitotischer Zellen auf. Der Anteil der mitotischen Zellen wurde durchflusszytometrisch mittels H3P-Färbung bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen aus 4 in A bzw. aus 3 in B Experimentansätzen wieder.*

4.4.4 G2/M-Checkpoint in MCPH1-defizienten Zelllinien

Zur Untersuchung der Funktion des G2/M-Checkpoints in MCPH1-defizienten Zelllinien wurde der mitotische Index der Zellen vor und nach ionisierender Bestrahlung bestimmt. Dazu wurden B-LCLs von einem Patienten mit der homozygoten MCPH1-Missensmutation c.80C>G (p.T27R) sowie von zwei Patienten mit den homozygoten trunkierenden MCPH1-Mutationen c.427dupA (p.T143NfsX5) bzw. c.74C>G (p.S25X) verwendet. Als normale Kontrollen wurden zwei Zelllinien mit Wildtyp-MCPH1 (K1, K2) verwendet, als abnormale Kontrolle diente eine ATM-defiziente Zelllinie (AT, *Ataxia teleangiectatica*) mit defekter G2/M-Checkpoint-Arretierung. Die Zellen wurden mit 1 Gy Dosis bestrahlt und nach Ablauf von 2 h fixiert.

Alle drei MCPH1-defizienten Zelllinien wiesen eine intakte G2/M-Checkpoint-Arretierung auf. In den MCPH1-defizienten B-LCLs betrug der Anteil mitotischer Zellen nach Bestrahlung höchstens 0,09 %, ähnlich wie in den normalen Kontrollen, in denen höchstens 0,16 % an H3P-positiven Zellen nach der Bestrahlung nachgewiesen wurden (Abb. 4.35). In der AT-Kontrolle waren dagegen 0,68 % der Zellen mitotisch aktiv. Damit war in bestrahlten MCPH1-defizienten B-LCLs der Anteil der H3P-positiven Zellen um mindestens 93 % reduziert, ähnlich wie in normalen Kontrollzellen, in denen nach der Bestrahlung eine Abnahme von ca. 90 % festgestellt werden konnte (Abb. 4.35). Dagegen zeigte die AT-Zelllinie eine Abnahme von lediglich 47,5 % und damit eine beeinträchtigte Funktion der G2/M-Checkpoint-Arretierung.

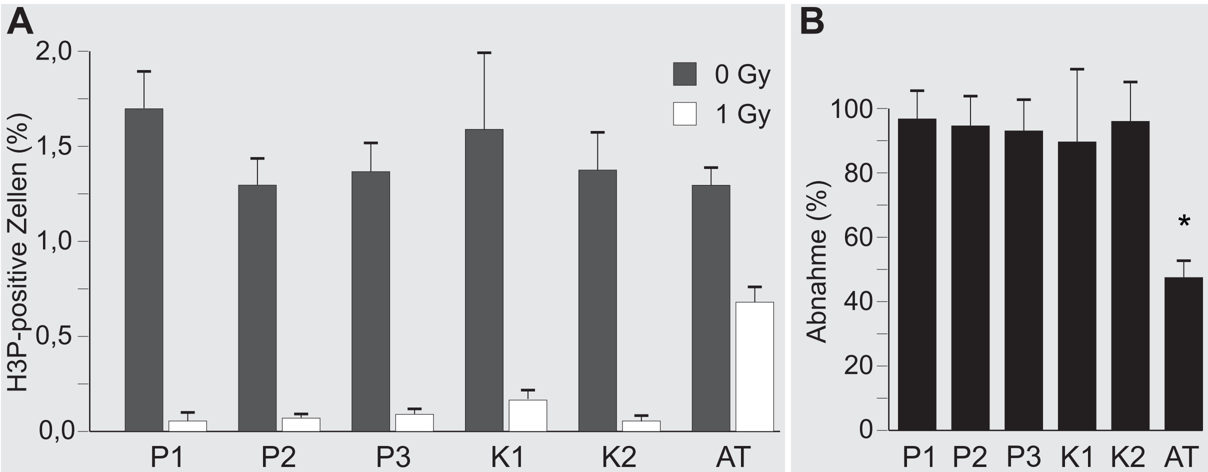


Abbildung 4.35 *Strahlen-induzierte G2/M-Checkpoint-Arretierung von MCPH1-defizienten Zelllinien.* ***A.*** *Anteile mitotischer Zellen vor und nach der Bestrahlung (durchflusszytometrische Analyse mittels H3P- und DAPI-Färbung). P1 – P3: B-LCLs von MCPH1-Patienten mit den Mutationen T27R, T143NfsX5 bzw. S25X; K1 und K2: normale Kontroll-B-LCLs; AT: ATM-defiziente Zelllinie.* ***B.*** *Relativer Rückgang der mitotischen Zellen 2 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. * $p < 0{,}05$; ANOVA.*

Nach Bestrahlungs-induzierten DNA-Schäden verweilen Zellen in einer G2/M-Arretierung bis die Schäden repariert worden sind, um anschließend die Mitose zu passieren. Um die Dauer dieser G2-Blockierung abzuschätzen, wurde der zeitliche Verlauf der mitotischen Indices von MCPH1-defizienten B-LCLs und Kontrollen für insgesamt 12 h nach Bestrahlung mit 1 Gy analysiert. Wie Diagramm in Abb. 4.36 zeigt, trat bei den normalen Kontrollen eine fast vollständige G2/M-Arretierung schon nach 1 h auf, während bei den MCPH1-defizienten B-LCLs zu diesem Zeitpunkt noch 0,23 % bzw. 0,37 % H3P-positive Zellen nachgewiesen wurden. 2 h nach der Bestrahlung ging der Anteil mitotischer Zellen bei MCPH1-defizienten wie auch normalen Kontrollzellen nahezu völlig zurück. Der Wiederanstieg mitotischer Zellen trat bei MCPH1-defizienten B-LCLs verspätet auf. Während die normalen Kontrollzellen die G2/M-Arretierung schon nach 3 h verlassen, so dass man in diesen Proben 4 h nach Bestrahlung 0,35 % bzw. 0,98 % H3P-positive Zellen messen konnte, verließen die MCPH1-defizienten Zellen erst nach 4 h die Checkpoint-Arretierung. Bei den AT-Zellen wurde keine wesentliche Fluktuation des mitotischen Index nach Bestrahlung beobachtet. Diese Daten zeigen, dass MCPH1-defiziente Zelllinien einen intakte G2M-Checkpoint-Funktion besitzen. Es könnte aber ein leicht verspäteter Eintritt in die G2/M-Arretierung und eine verlangsamte Relaxation aus der Blockierung vorliegen.

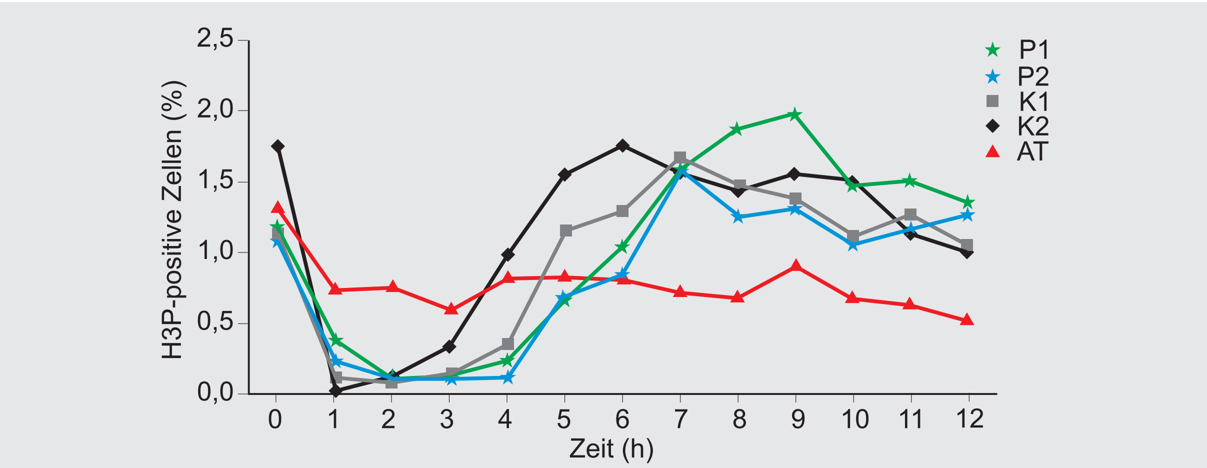


Abbildung 4.36 *Strahlen-induzierte G2/M-Checkpoint-Arretierung und -Relaxation in MCPH1-defizienten Zellen. Zeitlicher Verlauf der mitotischen Indices von bestrahlten (1 Gy) B-LCLs (durchflusszytometrische Analyse mittels H3P- und DAPI-Färbung). P1 und P2: Patientenzelllinien mit den homozygoten Mutationen T143NfsX5 bzw. S25X; K1 und K2: normale Kontroll-B-LCLs; AT: ATM-defiziente Zelllinie.*

4.4.5 G2/M-Checkpoint in Mcph1-defizienten Maus-Fibroblasten

Im Rahmen einer Charakterisierung eines Mcph1-*knock-in*-Mausmodells wurde die Strahlen-induzierte G2/M-Checkpoint-Funktion in Maus-Fibroblasten untersucht. In diesem Mausmodell war mit der *Gene-trap*-Methode ein *β-geo*-Reportergen in Intron 12 des *Mcph1*-Gens inseriert worden, wodurch ein trunkiertes Mcph1-Protein mit fehlender letzter C-terminaler BRCT-Domäne resultierte (für Details s. Ref. [96]). Drei Mcph1-defiziente und drei normale Kontroll-Zelllinien von adulten Mäusen wurden mit 4 Gy bestrahlt und 2 h bzw. 4 h später für die H3P-Färbung präpariert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass der Anteil von H3P-positiven Fibroblasten in Mcph1-defizienten und Kontrollkulturen 2 h und 4 h nach der Bestrahlung stark zurückgegangen war (Abb. 4.37). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Mcph1-*knock-in*-Zellen und Kontrollen festgestellt werden (2 h $p = 0{,}118$, 4 h $p = 0{,}200$; einseitiger t-Test). Diese Ergebnisse aus dem Mausmodell unterstützen die Ergebnisse aus humanen Zellen, wonach eine Defizienz von MCPH1 die Funktion des G2/M-Checkpoints nicht beeinträchtigt.

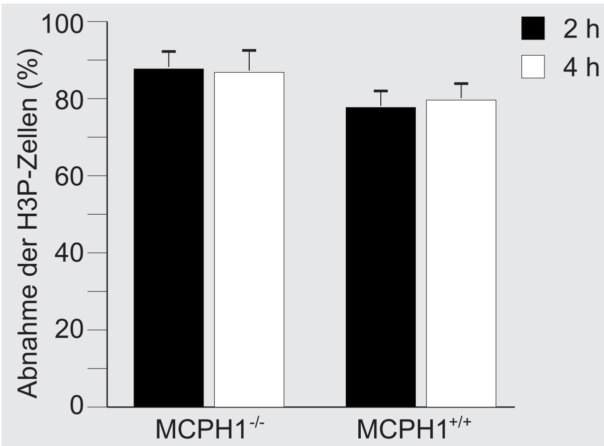


Abbildung 4.37 *G2/M-Checkpoint-Funktion in Mcph1-defizienten Maus-Fibroblasten. Gezeigt ist die prozentuale Abnahme von H3P-positiven Zellen 2 h (schwarze Balken) bzw. 4 h (weiße Balken) nach Bestrahlung mit 4 Gy. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus Messungen von jeweils drei Mcph1-defizienten bzw. Mcph1-profizienten Maus-Fibroblastenlinien mit dazugehörigen Standardabweichungen.*

5 Diskussion

Während dieser Arbeit wurden alternative Transkript-Isoformen des humanen *MCPH1*-Gens charakterisiert. *MCPH1* kodiert für Microcephalin – ein Protein, dem unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden, unter anderem in der Regulierung der Chromosomenkondensation und in der DNA-Schadenserkennung. Nach meinem besten Wissen ist dies die erste Studie, in der über die Existenz mehrerer MCPH1-Isoformen berichtet wird. Alternatives Spleißen wurde lange Zeit als ein eher seltenes Ereignis angesehen. Nach neueren Erkenntnissen ist aber davon auszugehen, dass die Mehrheit der menschlichen Gene für mehrere Protein-Isoformen kodiert. So wird geschätzt, dass 92 – 97 % der humanen multiexonischen Gene von mindestens einem zusätzlichen alternativen Spleißereignis betroffen sind [97]. Dabei ist nicht nur das alternative Spleißen der Prä-mRNA die Ursache für multiple Protein-Isoformen eines Gens, sondern auch die Anzahl der mRNA-Varianten eines einzigen Gens kann von zwei bis mehrere tausend stark variieren. Die alternativen mRNA-Varianten können wiederum durch Benutzung alternativer Transkriptionsstartstellen bzw. durch alternative Polyadenylierung entstehen. Diese Vielfalt der Entstehungsweise alternativer Transkriptformen spiegelt sich beispielhaft in den *MCPH1*-Isoformen wieder: Die Variante *MCPH1Δe9-14* entsteht durch ein alternatives Polyadenylierungssignal im Intron 8, während die *MCPH1Δe8*-Variante ihre Ursache im Exon-8-Skippen hat. Für beide Prozesse scheint die schwache 5'-Spleißstelle von Introns 8 ursächlich zu sein. Die Existenz eines alternativen Transkripts muss jedoch nicht mit einer funktionellen Bedeutung der betreffenden Variante gleichbedeutend sein. Neben der Expressionsstärke ist die evolutionäre Konservierung einer mRNA-Variante ein Indiz für deren funktionelle Signifikanz. Denn viele wichtige Spleißalternativen sind unter den Säugetieren bzw. Wirbeltieren hoch konserviert. Nichtsdestotrotz können neue Spleißvarianten spezifisch für eine bestimmte Art sein. Demnach scheinen nur die Isoformen *FL* und *Δe9-14* die Haupttranskripte des *MCPH1*-Gens zu sein, da diese beiden Varianten eine ähnlich starke Expression in den untersuchten humanen Geweben aufwiesen. Zudem exprimiert das *Drosophila*-orthologe von *MCPH1* zwei Isoformen - *mcph1(L)* und *mcph1(S)* - die den humanen Isoformen *MCPH1-FL* bzw. *Δe9-14* entsprechen [47, 98]. Die schwache *MCPH1Δe8*-Expression deutet dagegen darauf hin, dass dieses Transkript eher ein Nebenprodukt des Spleißvorgangs ist und daher vermutlich keine große funktionelle Relevanz besitzt. Andersseits hat die

ektopische Expression dieser Variante Einblicke in Kernlokalisierung von MCPH1 sowie in Komplementation des PCC-Phänotyps gestattet, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

Eine interessante Beobachtung war, dass die Expression von *FL* und *Δe9-14* antagonistisch während des Zellzyklus reguliert wird. Da diese beiden Varianten gleiche 5'-Region aufweisen, wie 5'-RACE-Experimente zeigten, muss deren Expression vom gleichen Promotor gesteuert werden. Daher wird die Abundanz der jeweiligen Variante während des Zellzyklus möglicherweise posttranskriptionell kontrolliert. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass die beiden Transkript-Isoformen unterschiedliche 3'UTR-Sequenzen aufweisen. 3'UTR-Sequenzen bieten Bindungsstellen für regulatorische Elemente wie MicroRNAs (miRNA). Dies sind hoch konservierte, nicht-kodierende RNAs von ca. 22 Nukleotiden Länge, die wichtige regulatorische Rolle in Tier- und Pflanzenzellen spielen, indem sie durch Bindung an die 3'UTRs der mRNAs deren Degradation bzw. Translation beeinflussen [99]. Die spezifische Bindung einer miRNA an ihre Zielsequenz erfolgt über komplementäre Basenpaarung, so dass durch Sequenzanalyse einer 3'UTR eine Vorhersage über potentielle miRNA-Bindungspartner gemacht werden kann. Die Analyse der 3'UTRs mit dem Algorithmus *MicroInspector* [100] lieferte für *MCPH1-FL* Bindungsstellen für 97 unterschiedliche miRNA-Spezies, während für *MCPH1Δe9-14* Bindungsstellen für 52 verschiedene miRNAs detektiert wurden. Lediglich 11 miRNA-Spezies waren beiden Varianten gemeinsam, wie Abb. 5.1 zeigt. Diese, offenbar selektive miRNA-Muster könnten die Zellzyklus-abhängig unterschiedliche Regulierung von *MCPH1-FL* und *-Δe9-14* erklären. Ein in diesem Zusammenhang instruktives Beispiel bietet das murine Zellzyklus-Protein p27^{kip1}, von dem zwei Isoformen exprimiert werden. Diese werden von zwei Transkripten mit unterschiedlichen 3'UTRs kodiert. Es wird jedoch nur eine dieser beiden Isoformen durch miRNAs miR-221/-222 reguliert [101]. Es wäre daher von großem Interesse, zukünftig experimentell zu überprüfen, ob tatsächlich eine miRNA-vermittelte Regulation der MCPH1-Expression stattfindet.

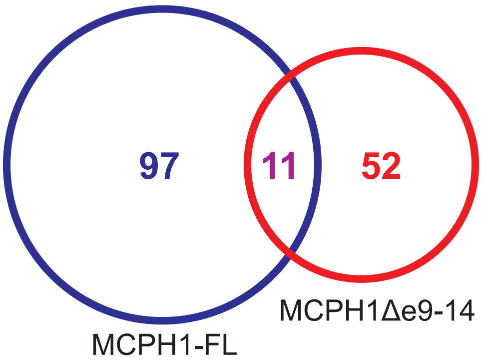


Abbildung 5.1 *Hypothetische miRNA-Bindungsstellen. Die Kreisflächen sind proportional der Anzahl der potenziellen miRNAs, die spezifisch für MCPH1-FL bzw. MCPH1Δe9-14 sind, während die Schnittfläche die Menge der gemeinsamen miRNA-Bindungsstellen darstellt (Zahlenangaben darin).*

Die unterschiedliche Expression von *MCPH1-FL* und *MCPH1Δe9-14* lässt vermuten, dass

deren Produkte unterschiedliche Funktionen ausüben könnten. Als Produkte desselben Gens sind allerdings auch viele gemeinsame Funktionen zu erwarten. So konnte durch Komplementationsversuche gezeigt werden, dass die beiden Varianten bei der Regulation der Chromosomenkondensation eine redundante Funktion besitzen. Dies ist vermutlich auf das Vorhandensein der N-terminalen BRCT-Domäne in beiden Varianten zurückzuführen. Dass diese Domäne für die Vermeidung von PCC zuständig bzw. unentbehrlich ist, wurde durch das GFP-MCPH1-Konstrukt mit deletierten ersten 7 Exons verifiziert. Dieses Konstrukt kodiert für ein Microcephalin ohne die N-terminale BRCT-Domäne. Es war nicht in der Lage, die charakteristische Störung der Chromosomenkondensation in MCPH1-defizienten Zellen zu komplementieren. Einen weiteren deutlichen Hinweis auf die Bedeutung der N-terminalen BRCT-Domäne für die zeitgerechte Chromosomenkondensation gab die homozygote Missensmutation c.80C>G in Zellen eines MCPH1-Patienten. Dieser Basenaustausch resultiert in der Substitution eines hoch konservierten Threonins durch Arginin, und zwar genau innerhalb der kritischen N-terminalen BRCT-Domäne des Microcephalins [41]. Diese Mutation vermochte den PCC-Phänotyp in Patientenzellen herbeizuführen, wenn auch der Anteil von PLCs geringer war als bei Patientenzellen mit *bona fide* trunkierenden Mutationen in *MCPH1*. Eine zusätzliche Bestätigung für die Rolle der N-terminalen BRCT-Domäne in der Regulation der Chromosomenkondensation lieferte die Aufklärung der Struktur dieser Domäne durch Richards et al. [102]. Im Gegensatz zu der C-terminalen BRCT-Tandem-Domäne des Microcephalins und zu BRCT-Domänen in anderen Proteinen fehlen in der N-terminalen BRCT-Domäne die Aminosäurereste, die für die Phosphatbindung zuständig sind. Nichtsdestotrotz besitzt die N-terminale BRCT-Domäne des MCPH1 an der gleichen Stelle eine hydrophobe Tasche, über welche vermutlich diejenigen Proteininteraktionen stattfinden, die PCC unterbinden. Die ektopische Expression von Maus-Mcph1-Konstrukten mit Mutationen in der hydrophoben Tasche (einschließlich des erwähnten Austausches von Threonin durch Arginin) konnte den PCC-Phänotyp von Mcph1-defizienten Mausembryonalzellen nicht komplementieren [102]. Ein ähnliches Ergebnis wurde in einer weiteren Studie erzielt, in welcher gezeigt wurde, dass embryonale Mausfibroblasten mit defektem *Mcph1*-Gen ebenso wie die menschlichen MCPH1-Mutanten den PCC-Phänotyp aufweisen. Wie in den humanen Zellen war der PCC-Phänotyp auch in den murinen Zellen nur mit Mcph1 komplementierbar, das die N-terminale BRCT-Domäne enthhielt [43]. Dennoch bleibt die Frage nach dem genauen Wirkungsmechanismus von MCPH1 in der Regulierung der Chromosomenkondensation bisher unbeantwortet. In vorangehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass Condensin II vermehrt an Chromosomen von PLCs lokalisiert war und dass die Herunterregulation von Condensin II in MCPH1-defizienten Zellen zu einer deutlichen Verminderung der Rate an PLCs führt [35]. Plausibel wäre, dass MCPH1 mit der vorzei-

tigen Bindung von Condensin II an Chromosomen interferiert. In einer weiteren Studie wurde eine direkte Interaktion von MCPH1 mit Condensin II gezeigt [43]. Dieser Studie zufolge soll für die Interaktion nicht die N-terminale, sondern die mittlere Region von Microcephalin von Bedeutung sein. Demgegenüber konnte ich in Rahmen meiner Arbeit zeigen, dass das Produkt der MCPH1-Spleißvariante Δe8, dem diese mittlere Region fehlt, den PCC-Phänotyp vollständig zu komplementieren vermag. Ein ähnliches Resultat ergab sich in der Studie von Wood et al. [43]. Diese Autoren konnten zeigen, dass ein MCPH1-Deletionskonstrukt, dem die Condensin II-Interaktionsdomäne fehlt, den PCC-Phänotyp in MCPH1-defizienten Mausfibroblasten ebenfalls komplementiert. Daraus kann man folgern, dass entweder für die PCC-Prävention keine direkte Interaktion zwischen MCPH1 und Condensin II notwendig ist, oder dass die bisherigen Kartierungsansätze der Interaktionsdomäne nicht den tatsächlichen Gegebenheiten entsprechen.

Die Expression von MCPH1Δe8 gestattete ebenfalls Einblicke in die Zellkernlokalisation von MCPH1. Da diese Isoform trotz des Fehlens der kanonischen NLS-Sequenz im Zellkern lokalisiert werden konnte, gab dies den Anstoß zur Suche nach weiteren Kernlokalisationssignalen in MCPH1. Wood et al. [103] haben in ihrer Veröffentlichung 2007 beschrieben, dass die kanonische NLS (NLS2 in vorliegender Arbeit) für die Kernlokalisierung von MCPH1 wichtig ist. Allerdings beruhte diese Beobachtung auf MCPH1-Deletionsvarianten, die nur die N-terminale Region von Microcephalin enthielten, so dass keine Aussage über die Existenz bzw. Funktion von putativen weiteren NLS gemacht werden konnte. Das Vorhandensein mehrerer NLS-Sequenzen in einem Polypeptid ist ein verbreitetes Charakteristikum unter den kernspezifischen Proteinen [104, 105]. Durch derartige zusätzliche NLS-Domänen wird sichergestellt, dass trotz eventuell auftretender Punktmutationen in einer der NLS der Kerntransport stattfinden kann. Darüber hinaus kann eine Vielzahl an NLS die Protein-Transporter-Interaktionen erhöhen, so dass der Kernimport des entsprechenden Proteins effektiver bewerkstelligt werden kann [106]. Die Position der hier erstmals beschriebenen NLS3 in unmittelbarer Nähe zu der C-terminalen BRCT-Domäne reflektiert eine weitere Eigenschaft von nukleophilen Proteinen. Denn NLS-Sequenzen befinden sich oft in der Nähe von bzw. sind integriert in Domänen, die für die Interaktionen mit DNA oder anderen Proteinen wichtig sind [107].

Dass die C-terminalen Domänen von MCPH1 für solche Interaktionen zuständig sind, ergibt sich aus mehreren unabhängigen Beobachtungen in humanen und in Tiermodell-Zellen [90, 103, 124]. Grundsätzlich ist man darüber einig, dass die BRCT-Tandem-Domäne für die Funktionen des Microcephalins in der DNA-Schadenserkennung bzw. -Schadensantwort unentbehrlich ist. In dieser Hinsicht würden die zwei *MCPH1*-Haupttranskripte für Proteine mit divergenten Funktionen kodieren. Denn es konnte durch meine Untersuchungen eindeutig gezeigt werden, dass MCPH1-FL aber nicht MCPH1Δe9-14 mit

γH2AX-Foci kolokalisiert. γH2AX ist die am Serin-139 phosphorylierte Form des Histons H2AX [92]. Diese Phosphorylierung findet spezifisch an DNA-Doppelstrangbruchstellen (DSB) durch ATM und DNA-PK statt [108]. Sie dient als Markierung, um die Komponenten der DNA-Reparaturmaschinerie zu den DNA-Bruchstellen zu dirigieren. In einer Reihe von Proteinen, die an der DNA-DSBs-Focus-Bildung beteiligt sind, finden sich typischerweise C-terminale BRCT-Tandemmotive. So sind z. B. die BRCT-Domänen von PTIP und BRCA1 für deren Lokalisation an Strahlungs-induzierten Foci notwendig [109]. Auch MDC1 bindet über sein BRCT-Tandem direkt an γH2AX [110]. Durch diese Interaktion, die Teil der DNA-Schadensreparatur und nicht Teil der Checkpointkaskade ist, soll die Akkumulation von weiteren DNA-Reparaturproteinen und deren Assoziation mit den DNA-Bruchstellen befördert werden [110]. Mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (*ITC assay*) wurde gezeigt, dass die C-terminale BRCT-Tandem-Domäne von MCPH1 *in vitro* ähnliche Bindungsaffinität zu γH2AX hat. Wie bei MDC1 beruht diese Affinität auf der Phosphorylierung von Serin-139 des γH2AX-Proteins [103]. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass die Strahlungs-induzierte Bildung von MCPH1-Foci unabhängig von den klassischen Sensor- und Mediatorproteinen der DNA-Reparaturkaskade (wie ATM, BRCA1, MDC1, 53BP1 und MRN- sowie FA-Komplexen) stattfindet [103]. Lediglich in H2AX-defizienten Mausfibroblasten wurde eine Beeinträchtigung der MCPH1-Foci-Bildung beobachtet, die durch eine ektopische Expression von H2AX behoben werden konnte [103]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist die γH2AX-Foci-Bildung von MCPH1 unabhängig. Denn einerseits war nicht in allen γH2AX-Foci MCPH1 anwesend, und anderseits wurden in MCPH1-defizienten Zellen γH2AX-Foci nachgewiesen. Wegen der fehlenden Beteiligung von MCPH1 an etablierten Signalwegen zur DNA-Schadenserkennung ist anzunehmen, dass die Rolle von MCPH1 in der Formation von DNA-DSB-induzierten Foci eher akzessorischer Natur ist. Vermutlich wird MCPH1-FL mittels seines BRCT-Tandems durch γH2AX an DNA-Bruchstellen gelenkt und gebunden. Durch seine Interaktion mit Condensin II und/oder mit dem Chromatin-Remodeling-Komplex SWI/SNF (s. unten) würde dann die Chromatin-Relaxation an diesen Stellen herbeigeführt. Diese Relaxation könnte die Zugänglichkeit für Komponenten der DNA-Reparaturmaschinerie an geschädigte DNA-Stellen erhöhen, so dass der DNA-Reparatur-Prozess schneller und effizienter vorangetrieben werden kann. Im Einklang mit dieser Hypothese stehen in dieser Arbeit beschriebene Hinweise, dass MCPH1-defiziente humane lymphoblastoide Zellen eine leicht verzögerte Strahlungs-induzierte G2/M-Checkpoint-Arretierung bzw. einen etwas späteren Austritt aus dieser Arretierung aufweisen könnten. Offenbar hindert die aufgrund des PCC-Defekts stärkere Kompaktion des Chromatins in MCPH1-defizienten Zellen die Zugänglichkeit von DNA-Reparaturproteinen zu DNA-DSBs. Damit übereinstimmend wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass in Mcph1-

defizienten Zellen die Affinität der DNA-Reparaturproteinen Rad51 und Brca2 an DNA-DSBs stark herabgesetzt ist, während die Expression dieser Proteine nicht beeinträchtigt war [111].

Eine Reihe von Studien beschreiben funktionelle Konsequenzen einer MCPH1-Depletion mittels RNA-Interferenz. Diese Konsequenzen reichen von defektem Checkpointarrest, Beeinträchtigung der Foci-Bildung von einigen wichtigen Mediator- sowie Effektorproteinen der DNA-Schadensantwort bis hin zur Herabsetzung der Expression von *BRCA1* und *CHK1* [93, 38, 39]. In der vorliegenden Arbeit ergaben sich zwar Hinweise auf eine Verzögerung, jedoch konnte keine generelle Beeinträchtigung der Strahlen-induzierten G2/M-Checkpoint-Arretierung in MCPH1-defizienten Patientenzellen festgestellt werden. Alderton et al. [37] konnten zeigen, dass die *BRCA1*- und *CHK1*-Expression in MCPH1-defizienten Patientenzellen nicht herunterreguliert ist – eine Beobachtung, die in dieselbe Richtung weist wie die eigenen Untersuchungen. Die Ursachen für diese Diskrepanz zu den Studien, die mittels RNA-Interferenz durchgeführt wurden, könnten einerseits in sogenannten *Off-target*-Effekt des RNA-Interferenz-Assays liegen, der sich in einer unspezifischen Suppression mehrerer Gene äußert [95]. Entsprechend wäre es denkbar, dass eines der unspezifisch ausgeschalteten Gene als ein Bestandteil der Checkpointkaskade fungiert. Diese Möglichkeit ließe sich durch Analyse der Gesamtgenomexpression mittels Microarray-Technologie überprüfen. Anderseits konnte das Ergebnis von Xu et al. [93] in vorliegender Arbeit nicht reproduziert werden. Denn Ausschaltung von MCPH1 durch RNA-Interferenz resultierte in den hier durchgeführten Experimenten nicht im Defekt der DNA-DSBs-induzierten G2/M-Checkpointarretierung.

In diesem Zusammenhang ist jedoch auch nicht völlig auszuschließen, dass in MCPH1-defizienten Patientenzellen trotz der Existenz von trunkierenden Mutationen ein MCPH1-Restprotein gebildet wird (Abb. 5.2). Bei einer der beiden in dieser Arbeit betrachteten Mutationen handelt es sich um die Insertion eines Adenins in Exon 5 (c.427dupA). Dadurch verschiebt sich der Leserahmen, so dass ein vorzeitiges Stoppcodon in Exon 6 entsteht. Das trunkierte Translationsprodukt enthält die N-terminale Region mit der BRCT-Domäne des Microcephalins. Theoretisch könnte ein ATG-Codon in Exon 6 eine Reinitition der Translation ermöglichen. Tatsächlich findet sich in Exon 6 von *MCPH1* ein ATG-Codon, von dem jedoch unklar ist, ob es zur Reinitiation der Translation verwendet wird. Wäre das der Fall, hätte dies die Expression von Microcephalin in zwei Fragmenten zur Folge, wie in der Abb. 5.2A dargestellt ist. Eine derartige Konstellation ist für das *NBN*-Gen beschrieben. Mutationen in diesem Gen verursachen das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS, OMIM #251260), welches unter anderem mit Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, Radiosensitivität und einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit assoziiert ist [112]. 90 % aller Betroffenen sind homozygote Träger der Mutation 657del5, die in ei-

ner Leserahmenverschiebung und vorzeitiger Trunkierung des Nibrin-Proteins resultiert [112]. Allerdings konnte für Nibrin-defiziente Zellen mit der beschriebenen Mutation gezeigt werden, dass neben dem trunkierten, nicht funktionellen N-terminalen Fragment die C-terminale Region durch eine interne Initiation der Translation synthetisiert wird [113]. Dieses Fragment kann offenbar Teilfunktionen von Nibrin erfüllen, wodurch das Überleben der betroffenen Zellen (und Patienten) gewährleisten wird. Dagegen sind nicht konditionale Nbn-*knock-out*-Mäuse nicht lebensfähig [114].

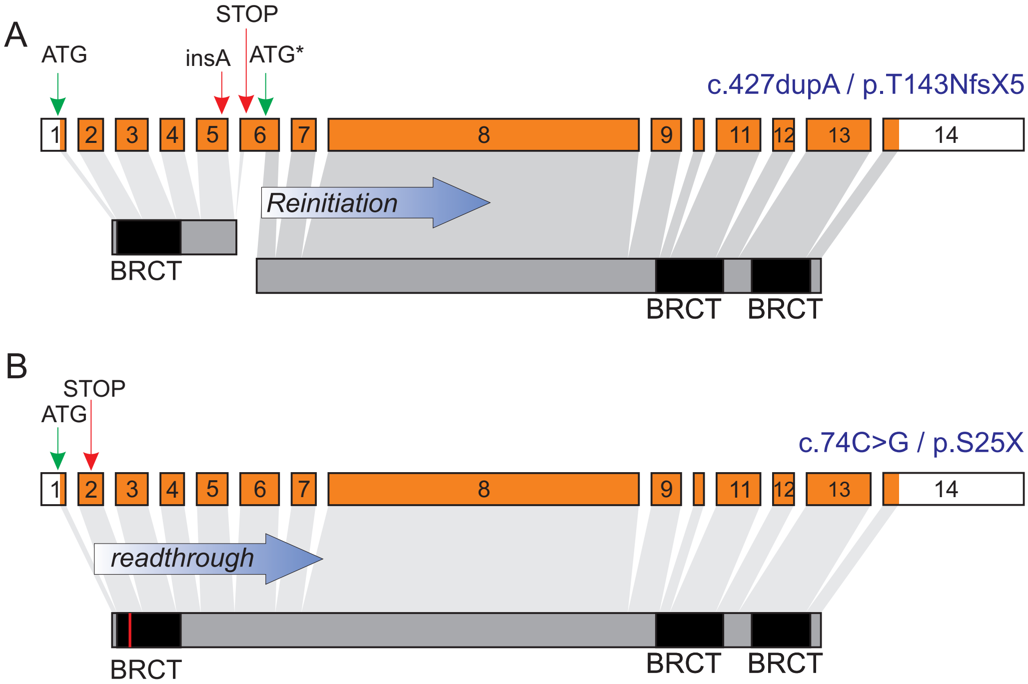


Abbildung 5.2 *Hypothetische Expression von Microcephalin bei MCPH1-Mutationen.* ***A****. Insertion eines Adenins in Exon 5 verursacht eine Leserahmenverschiebung, aus der ein vorzeitiges Stoppcodon in Exon 6 resultiert. Ein ATG-Codon in Exon 6 könnte eine Reinitition der Translation und sie Bildung eines Restproteins induzieren.* ***B****. Der Basenaustausch c.74C>G in Exon 2 verursacht ein vorzeitiges Stoppcodon an der gleichen Stelle. Ein hypothetisches* readthrough *des vorzeitigen Stoppcodons könnte in einer Expression des ganzen Proteins resultieren.*

Bei der zweiten in dieser Arbeit betrachteten *MCPH1*-Mutation handelt es sich um einen Basenaustausch von Cytosin nach Guanin in Exon 2 (c.74C>G), wodurch ein Stoppcodon an selbiger Stelle entsteht. Das trunkierte Fragment würde lediglich die Hälfte der N-terminalen BRCT-Domäne beinhalten. Ein als *readthrough* bezeichneter Mechanismus könnte die Synthese des gesamten MCPH1 in dieser Zelllinie trotz des vorzeitigen Stoppcodons bewirken. Dabei wird durch Bindung einer Suppressor-tRNA an ein Stopp-Triplett eine Aminosäure eingebaut, wodurch das Stoppcodon "überlesen" wird [115]. Im Falle beider Mutationen könnte die Expression eines Restproteins die Diskrepanz zwischen MCPH1-defizienten Patientenzellen und RNA-Interferenz erklären. Allerdings unterliegt laut Alderton et al. [37] MCPH1^{427insA}-mRNA (jedoch nicht MCPH1^{C74G}-mRNA) ei-

nem NMD-Abbau (*nonsense mediated decay*), so dass die Expression des trunkierten N-terminalen Fragments sowie des C-terminalen Restproteins in MCPH1^{427insA}-Zellen unwahrscheinlich ist. Falls aber *Full-length*-MCPH1 der MCPH1^{C74G}-Zelllinie Funktionen von wt-MCPH1 in der G2/M-Checkpointkaskade komplementieren würde, dann sollte dieses Produkt auch das Potential haben, PCC in diesen Zellen ebenfalls zu unterdrücken, was aber nicht der Fall ist. In kritischer Bewertung kann daher die oben erläuterte Diskrepanz nicht mit der Annahme eines hypothetischen MCPH1-Restproteins erklärt werden. In Anbetracht meiner Befunde, dass ein G2/M-Checkpoint-Defekt weder in MCPH1-defizienten Patientenzellen beobachtet noch in Zellen durch siRNA-vermittelte MCPH1-Depletion induziert werden konnte, sind die zitierten Ergebnisse von Xu et al. mit Vorbehalten zu betrachten. Zudem liefern die Versuche mit *Drosophila*- und murinen Tiermodellen weitere Evidenz dafür, dass MCPH1 für Aufrechterhaltung des DNA-Checkpoints nicht notwendig ist. So fanden zwei Arbeitsgruppen heraus, die unabhängig voneinander das *Drosophila*-orthologe *MCPH1*-Gen entdeckten, dass weder die Expression von *CHK1* noch die G2/M- oder die Intra-S-Checkpoint-Arretierung in *mcph1*-Mutanten beeinträchtigt sind [47, 98]. Eine intakte G2/M-Checkpoint-Arretierung in einem Mcph1-defizientem Maus-Tiermodell [96] bekräftigt zusätzlich die Annahme, dass MCPH1 nicht direkt in diese Checkpoint-Signalkaskade involviert ist. Anscheinend beruht die offensichtliche Diskrepanz zwischen den hier erhobenen und den Literaturdaten auf einer sehr konträren Interpretation der jeweiligen Ergebnissen.

Obwohl eine centrosomale Lokalisation des humanen MCPH1-Proteins in Studien zweier Arbeitsgruppen [46, 45] postuliert wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit für keine der ektopisch exprimierten GFP-MCPH1-Isoformen eine Centrosomen-spezifische Lokalisation nachgewiesen werden. Eine ernstzunehmende Problematik bei der Untersuchung des *MCPH1*-Produkts bzw. der *MCPH1*-Produkte war das Fehlen hoch affiner, monospezifischer Antikörper. Der immunologische Nachweis des endogenen Microcephalins auf Western-Blots mittels kommerziell erhältlicher Antikörpern zeigte multiple unspezifische Banden, die teilweise das eigentliche spezifische Signal überdeckten. In vielen veröffentlichten Studien wurde für die Detektion von endogenem MCPH1 von den betreffenden Gruppen selbst produzierte Antiseren verwendet, so dass unterschiedliche Ergebnisse auf divergenten Eigenschaften der verwendeten Antikörper beruhen könnten. In der Tat konnte ich mit dem MCPH1-Antikörper, der von Tibelius et al. [46] verwendet wurde, keine der in vorliegender Arbeit beschriebenen GFP-MCPH1-Isoformen nachweisen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die GFP-Sequenz das Erkennungsepitop dieses Antikörpers maskieren könnte, welches am N-terminalen Ende des Microcephalins liegt. Um dies zu überprüfen, sollte man C-terminal-gekoppelte MCPH1-GFP-Konstrukte erzeugen oder einen anderen N-terminalen Protein-Tag verwenden und dann versuchen, MCPH1 in solchen

Konstrukten mit dem Antikörper von Tibelius et al. [46] nachzuweisen. Solange bleibt die Frage offen, ob das von diesem Antikörper erkannte Antigen eine weitere MCPH1-Isoform darstellt, oder ob es sich um ein völlig anderes Protein handelt. Denn das Antigen, das von diesem Antikörper erkannt wurde, fand sich im Cytoplasma verteilt. Diese Beobachtung widerspricht den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnissen einer klaren Zellkernlokalisation aller MCPH1-Isoformen. Obwohl für *mcph1* in *Drosophila* eine centrosomale Lokalisierung vorgeschlagen wurde [47], konnte diese experimentell ebenfalls bisher nicht bestätigt werden [47, 98]. Im Gegensatz dazu wurde für das Huhn-orthologe Protein von MCPH1 (cMcph1) - für ektopisch exprimiertes wie auch für endogenes cMcph1 - eine centrosomale Lokalisation in DT40-Zellen überzeugend gezeigt [90]. Interessanterweise konnten die Autoren dieser Studie mit dem von ihnen verwendeten cMcph1-spezifischen Antikörper das an Centrosomen gebundene endogene cMcph1 nachweisen, nicht aber endogenes cMcph1 in DNA-Reparaturfoci [90]. Diese Beobachtungen bekräftigen weiterhin die Annahme, dass entweder eine Centrosomen-spezifische MCPH1-Isoform existiert, oder dass centrosomale Signale für MCPH1 ein durch Antikörper-Kreuzreaktionen erzeugte Artefakte darstellen. In diesem Zusammenhang sollte auch darauf hingewiesen werden, dass solche unspezifischen Antikörper-Kreuzreaktionen sowie daraus resultierende falsche Schlussfolgerungen keine Seltenheit sind. Ein gutes Beispiel für eine derartige Fehlinterpretation ist der Erythropoietin-Rezeptor (EpoR, *erythropoietin receptor*), der auf der Oberfläche von erythroiden Vorläuferzellen exprimiert wird. In einer Reihe von Publikationen wurde über angebliche Expression dieses Rezeptors in humanen Tumoren berichtet, so dass dessen Expression mit der Proliferation der Tumorzellen assoziiert wurde. In einer folgenden Studie von Elliott et al. [116] wurde allerdings festgestellt, dass die verwendeten α-EpoR-Antikörper Kreuzreaktionen eingingen und dass die 66 kDa-Bande, die EpoR zugeschrieben wurde, in Wirklichkeit durch das Hitzeschockprotein HSP70 verursacht wurde. Damit wurden die Ergebnisse einer Vielzahl vorhergehender Studien in Frage gestellt bzw. invalidiert.

Eine Ursache für Diskrepanzen zwischen verschiedenen Studien, welche die Aufklärung der Funktion des Microcephalins zum Ziel hatten, liegt möglicherweise auch an falschen Prämissen, die sich aus der Annahme eines einheitlichen pathogenetischen Mechanismus genetischer Formen primärer Mikrozephalie ergeben. Denn wenn man davon ausgeht, dass die Mutationen in jedem der MCPH-Gene primäre Mikrozephalie verursachen, und dass die Produkte dreier dieser Gene (ASPM, CENPJ, CDK5RAP2) eine centrosomale bzw. Spindelpol-spezifische Lokalisation aufweisen, ist man versucht, für MCPH1 ebenfalls eine mit Centrosomen assoziierte Funktion anzunehmen. Bei unvoreingenommener Sichtweise und kritischer Evaluation aller vorliegenden Daten kann jedoch keinesfalls ausgeschlossen werden, dass der gemeinsame Phänotyp "Mikrozephalie" der verschiedenen

MCPH-Patienten durch völlig unterschiedliche pathogenetische Prozesse verursacht wird. Dieser Gedanke soll nun im Folgenden eingehender analysiert werden.

Als führende Hypothese zur Erklärung der Genese von Mikrozephalie gilt die Annahme, dass dieses phänotypische Merkmal grundsätzlich durch eine Beeinträchtigung der mitotischen Teilungen während der Neurogenese entsteht [117]. Die corticalen Neurone stammen von Vorläuferzellen in der proliferativen Epithelzellschicht ab, die als ventrikuläre Proliferationszone den inneren Hohlraum des Neuralrohres säumt. [118]. Die mitotische Aktivität von neuronalen Stammzellen ist durch symmetrische und asymmetrische Zellteilungen kennzeichnet. Die symmetrische Zellteilung, bei der die mitotischen Spindeln parallel zur Epithelebene orientiert sind, liefert zwei Vorläuferzellen, während bei der asymmetrischen Teilung eine Vorläuferzelle sowie eine Nervenzelle entstehen. Die asymmetrische Teilung findet statt, wenn die mitotischen Spindeln perpendikulär zur Neuroepithel-Ebene orientiert sind [119]. Die entstehenden Neurone, die ihre Teilungsaktivität verlieren, verlassen die Proliferationszone und wandern an ihre Bestimmungsorte. Es ist einleuchtend, dass der Zeitpunkt des Umschaltens zwischen den beiden Zellteilungsarten während der Entwicklung entscheidend für die endgültige Zahl von Nervenzellen ist. Denn wird zu früh vom symmetrischen zum asymmetrischen Teilungsmodus umgeschaltet, ist der Pool der Vorläuferzellen zu klein und konsequenterweise auch die Zahl der daraus resultierender Nervenzellen. Deswegen unterliegt die Umschaltung zwischen den beiden Teilungsmodi einer feinen Regulierung. Mutationen in Genen, die an dieser Regulierung beteiligt sind, könnten ursächlich für Entwicklungsstörungen der Hirnrinde sein, wie dies der Fall bei der primären Mikrozephalie ist [120]. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist zwar noch nicht endgültig aufgeklärt, aber die bisherigen experimentellen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Centrosomen eine wichtige Rolle dabei spielen [121]. Auch ist über die Funktion der MCPH-Gene während der Neurogenese wenig bekannt. Es gibt dennoch einzelne Hinweise auf eine Beteiligung der MCPH-Proteine bei der Kontrolle des Umschaltens zwischen symmetrischen und asymmetrischen Zellteilungen. So wurde z.B. in Studien mit *Drosophila melanogaster* gezeigt, dass homozygote *asp*-Mutationen (*MCPH5*/ASPM) einen Metaphasen-Arrest während der asymmetrischen Zellteilungen im Gehirn der Larven bewirken [122]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Mutationen im *cnn*-Gen (*MCPH3*/CDK5RAP2) eine defekte asymmetrische Zellteilung in der männlichen Keimbahn zur Folge haben [123]. Die centrosomale Lokalisierung der MCPH-Genprodukte unterstützt zusätzlich die Hypothese, dass diese Proteine zu den regulatorischen Komponenten gehören könnten. Im Zusammenhang mit einer postulierten centrosomalen Funktion von MCPH1 wird jedoch außer Acht gelassen, dass *MCPH1*-Mutationen den PCC-Phänotyp verursachen, und dass Microcephalin an der Regulation der Chromosomenkondensation beteiligt ist. Daraus ergibt sich die nächste Frage, ob und in welchem

Zusammenhang die Chromatinkondensation mit der Neurogenese bzw. Mikrozephalie assoziiert sein könnte.

In einer im Hinblick auf diese Frage relevanten Studie wurde über die Interaktion von MCPH1 mit dem SWI/SNF-Komplex berichtet [124]. Dabei handelt es sich um einen Komplex aus mindestens acht Polypetiden, der eine ATP-abhängige Umstrukturierung des Chromatins bewirkt. In der bezeichneten Studie wurde die Interaktion von MCPH1 mit dem SWI/SNF-Komplex im Kontext der DNA-Schadensantwort untersucht. In diesem Kontext konnten die Autoren zeigen, dass die Interaktion mit MCPH1 die Bindungsaffinität von SWI/SNF an geschädigte DNA-Stellen erhöht. Dadurch wird die Chromatinrelaxation an diesen Stellen bewirkt, so dass die Zugänglichkeit des Reparaturapparates zu den Schadstellen erleichtert wird [124]. Die Aktivität von SWI/SNF beschränkt sich aber nicht nur auf DNA-Reparaturvorgänge *per se*, sondern betrifft ganz generell Prozesse, für welche DNA-Zugänglichkeit erforderlich ist. Dies schließt natürlich auch die DNA-Replikation, -Transkription bzw. -Rekombination ein [125]. Darüber hinaus wurde SWI/SNF mit dem Spleißapparat in Verbindung gebracht [126]. Dabei wurde gezeigt, dass SWI/SNF die Einbeziehung von alternativ gespleißten Exons durch eine Interaktion mit der RNA-Polymerase II (Pol II) begünstigt. Mechanistisch geschieht dies über die Kinetik der Pol II: eine niedrige Transkript-Elongationsrate favorisiert das Einbeziehen alternativ gespleißter Exons; eine hohe Rate bewirkt dagegen deren Herausspleißen (vgl. Abb. 1.11). Experimentelle Unterstützung findet die Präsenz dieses Mechanismus in der Beobachtung, dass Trichostatin A (ein Inhibitor der Histon-Deacetylierung) das Herausspleißen alternativer Exons favorisiert, da eine Hyperacetylierung der Histone den Durchlauf der transkribierenden Polymerase erleichtert [127]. Falls zutrifft, dass MCPH1 mit dem SWI/SNF-Komplex interagiert, wäre es denkbar, dass Mutationen im *MCPH1*-Gen möglicherweise Auswirkungen auf viele Spleißvorgänge haben könnten. Bekanntlich kommt dem alternativen Spleißen eine bedeutende Rolle in der evolutionären Entfaltung der proteomischen und funktionellen Komplexität vieler zellulärer Vorgänge zu. So spielt alternatives Spleißen auch in der Genese des Nervensystems der Vertebraten eine wichtige Rolle [64]. Es liegt daher auf der Hand, dass selbst eine geringfügige Beeinflussung der Spleißregulation ein abweichendes Transkriptom und dadurch eine Beeinträchtigung von Entwicklungsvorgängen zur Folge haben könnte. Im Fall der MCPH1-Patienten würde man vermuten, dass diese Beeinträchtigung nicht extensiv, sondern eher selektiv ist, da lediglich das Volumen des Hirncortex von Betroffenen reduziert ist. Die Hypothese einer zelltypspezifischen Beeinflussung des Transkriptoms durch *MCPH1*-Mutationen könnte überprüft werden, in dem man nach Unterschieden in den Transkriptomen von *MCPH1*-defizienten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen sucht. In den letzten Jahren verbesserte Microarray-Technologien erlauben es, mit Sonden, die spezifisch für die Exon-

Exon-Verknüpfungen sind [128], die globale Expression von alternativen Spleißvarianten zu quantifizieren und damit die Transkriptomvariation zwischen einzelnen Geweben oder Zelltypen, aber auch zwischen MCPH1-defizienten und nicht defizienten Zellen quantitativ und qualitativ zu erfassen.

In diesem Zusammenhang sollte die in der Literatur beschriebene Interaktion zwischen dem *MCPH6*-Genprodukt CENPJ und dem Protein 4.1R-135 nicht unerwähnt bleiben. Das Erythrozytenprotein 4.1 (4.1R), das ursprünglich als ein 80-kDa-Protein identifiziert wurde, spielt eine wichtige Rolle für die morphologische Intaktheit der Erythrozyten [129]. Zusätzlich zu diesem Protein wurden weitere 4.1R-Isoformen entdeckt, die durch alternatives Spleißen entstehen. Der Einbezug des alternativen Exons 2' erzeugt eine 135 kDa große 4.1R-Isoform (4.1R-135) mit einer alternativen N-terminalen Region. Diese spezielle Isoform, die in nicht-erythroiden Zellen exprimiert wird, wurde in Centrosomen lokalisiert [130]. Darüber hinaus wurde eine Interaktion mit dem ebenfalls centrosomalen Protein CPAP (*centrosomal P4.1-associated protein*) nachgewiesen. Diese Interaktion kommt über die N-terminale Region des 4.1R-135 und der Tcp-Domäne am C-terminus des CPAP zustande [131]. Bei der Entdeckung des *MCPH6*-Gens wurde festgestellt, dass von diesem Gen kodiertes Protein CENPJ identisch mit CPAP ist [29]. Interessanterweise beeinträchtigt eine der für Mikrozephalie kausalen *MCPH6*-Mutationen (p.E1235V) die Tcp-Domäne des CENPJ-Proteins [29]. Daher scheint es plausibel, dass die eventuelle Beeinträchtigung der SWI/SNF-abhängigen Regulierung des alternativen Spleißens in MCPH1-defizienten Zellen einen Einfluss auf die Expression der 4.1R-135-Isoform haben könnte. Dies würde wiederum mit der CENPJ/4.1R-135-assoziierten centrosomalen Funktion interferieren und könnte somit einer der Faktoren sein, der zur Mikrozephalie der MCPH1-Patienten führen. Diese Hypothese ließe sich überprüfen, indem man die centrosomale Lokalisierung von CENPJ und 4.1R-135 in MCPH1- bzw. MCPH6-defizienten Zellen analysiert und die Ergebnisse miteinander vergleicht. Dadurch ließe sich möglicherweise auch das bisherige funktionelle "Missing Link" zwischen MCPH1 und den restlichen MCPH-Proteinen auffinden.

Zusammenfassung & Ausblick Die kritische Bewertung der eigenen und der Literaturdaten hat eine Reihe von Widersprüchen hinsichtlich der postulierten Funktionen von Microcephalin zu Tage gefördert. Unbestritten und experimentell hinreichend gesichert ist, dass Microcephalin in den Signalwegen der Chromosomenkondensation sowie der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle spielt. Aufgrund jüngerer Literaturdaten erscheint es plausibel, dass die Beteiligung von MCPH1 an DNA-Reparaturvorgängen ebenfalls über die Regulierung der Chromatinverdichtung stattfindet. So ergibt sich ein hypothetisches Modell der möglichen funktionellen Rolle von MCPH1, wie es in Abb. 5.3 schematisch darge-

stellt ist. Danach werden mindestens drei MCPH1-Isoformen exprimiert. Die Expression einer weiteren Variante, die eventuell eine mit Centrosomen assoziierte Funktion besitzt, ist nicht auszuschließen. Alle drei gesicherten MCPH1-Isoformen sind Zellkernproteine. Dort sind sie primär an der Regulation der Chromosomenkondensation beteiligt. Diese Funktion wird über eine Interaktion mit den Komplexen Condensin II und SWI/SNF gewährleistet. Über Chromatinstrukturänderung werden Prozesse beeinflusst, für welche DNA-Zugänglichkeit entscheidend ist. Zu erwähnen sind:

- Chromosomenkondensation und -dekondensation während des Zellzyklus; Möglicherweise in Wechselwirkung mit Cyclin/CDK-Komplexen.
- Entwinden des Chromatins an DNA-Bruchstellen, offensichtlich in Wechselwirkung zwischen der C-terminalen BRCT-Tandem-Domäne und γH2AX.
- Regulation der Transkription in Zusammenarbeit mit dem Transkriptionsfaktor E2F1.
- Regulation der Telomerlänge und der DNA-Schadensreparatur an Telomeren in Wechselwirkung mit Komponenten des Telosomkomplexes TRF2.
- Beeinflussung alternativen Spleißens.

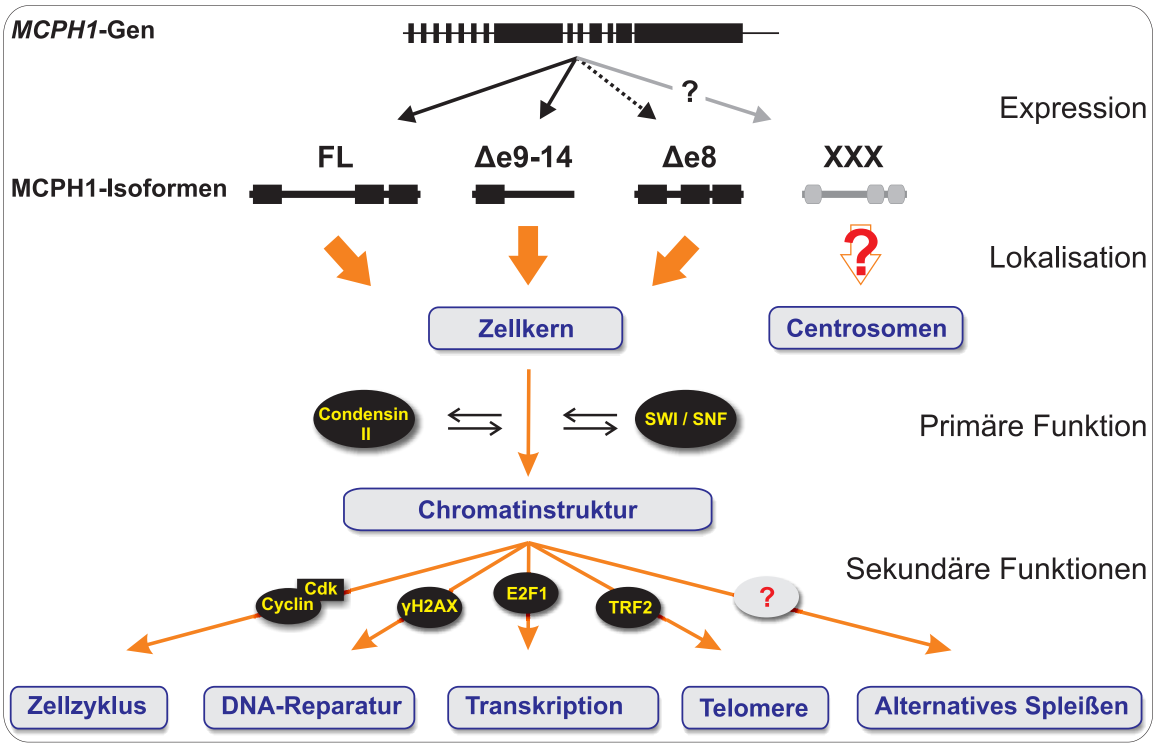


Abbildung 5.3 *Hypothetisches Modell der MCPH1-Funktionen. Alle drei in dieser Arbeit beschriebenen MCPH1-Isoformen sind im Zellkern lokalisiert. Eventuell wird eine weitere Isoform exprimiert, die mit Centrosomen assoziiert ist. Über die Regulation der Chromatinstruktur wird ein breites Spektrum an DNA-abhängigen Funktionen ausgeübt. Mögliche oder gesicherte Interaktionspartner sind durch schwarze Ovale dargestellt.*

Es bedarf sicherlich weiterer Experimente, um die Rolle von Microcephalin genauer aufzuklären und damit die Pathogenese des Phänomens "Mikrozephalie" besser zu verstehen. Denn betrachtet man die Mikrozephalie von MCPH1-Patienten als eine Art Atavismus, weil die Gehirngröße der Patienten derjenigen der von frühen Hominiden entspricht, so kommt dem pathogenetischen Verständnis des Merkmals "Mikrozephalie" auch eine Schlüsselrolle aus evolutionsbiologischer und anthropologischer Sicht zu. Tatsächlich gehört MCPH1 zu den 10 % der am schnellsten evolvierenden Genen in der zum Menschen führenden Linie [132]. Darüber hinaus bleibt aufzuklären, ob die Lebensfähigkeit der Menschen mit MCPH1-Mutationen auf einem durchweg hypomorphen Charakter dieser Mutationen beruht, oder ob z. B. redundante Komponenten der an der Neurogenese beteiligten Proteinkomplexe die Lebensfähigkeit dieser Patienten erklären könnte. Auch die funktionelle Relevanz bzw. die hypothetischen Funktionen der in meiner Arbeit erstmals beschriebenen Isoformen *MCPH1Δe8* und *MCPH1Δe9-14* bedarf weiterer Aufklärung. Denn das Verstehen der funktionellen Konsequenz eines alternativen Spleißerreignisses ist meist weit faszinierender als die pure Endeckung einer Variante.

Anhang I

Abkürzungen

Allgemein

α-	Anti- (Antikörperspezifität)
AS	Alternatives Spleißen
ASTD	Alternative Splicing and Transkript Diversity
BB	Branch point
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
BRCT	Breast cancer carboxy terminal
C	Cytidin
CDS	Coding sequence
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindol
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DSE	Downstream sequence element
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ESE	Exonic splicing enhancer
ESS	Exonic splicing silencer
FCS	Fetal calf serum
FL	Full length
for-, rev-	Forward, reverse (Primer)
G	Guanosin
gDNA	Genomische DNA
HKG	Housekeeping genes
hnRNPs	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
HRP	Horseradish peroxidase

LCL	Lymphoblastoid cell line
M	Methionin
miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger RNA
N	Nukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMD	Nonsense mediated decay
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCC	Premature chromosome condensation
PCR, q-	Polymerase chain reaction, quantitative
PLCs	Prophase-like cells
PolyA-	Polyadenylierungs-
R	Purin
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RLU	Relative light units
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SD	Standard deviation
siRNA	Small interfering RNA
snRNPs	Small nuclear ribonucleoprotein particels
SR-	Serine- and arginine-rich
SS	Spleißstelle
SV40	Simian virus 40
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	Uridin
UsnRNA	Uridine-rich small nuclear RNA
UTR	Untranslated region
Y	Pyrimidin
Y	Tyrosin

Gen- & Proteinbezeichnungen

4.1R	Erythrocyte 4.1 protein
4.1R-135	Nonerythrocyte 4.1 proteine 135 splice variant
γH2AX	Histon H2AX, Phospho-Serin 139
ASPM	Abnormal spindle-like microcephaly associated
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3 related
B2M	Beta-2-microglobulin
BRIT1	BRCT-repeat inhibitor of hTERT expression
CDK5RAP2	Cyclin-dependent kinase 5 regulatory associated protein 2
CENPJ	Centromeric protein J
CHK1/2	Checkpoint kinase 1/2
CPAP	Centrosomal P4.1-associated protein
CPSF	Cleavage and polyadenylation specifity factor
CstF	Cleavage stimulation factor
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DP1	Differentiation regulated transcription factor protein
E2F	E2 factor
GFP	Green fluorescent protein
H3P	Histon H3, Phospho-Serin 10
HPRT I	Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase I
MCPH1	Microcephalin
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint 1
MPF	M-phase promoting factor
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
PAP	PolyA-Polymerase
PCNT	Pericentrin
PLK1	Polo-like kinase 1
Pol II	RNA-Polymerase II
PTIP	Pax transactivation domain-interacting protein
Rb	Retinoblastoma tumor suppressor protein
STIL	SCL/TAL1 interrupting locus
SWI/SNF	Switch / sucrose non fermetable
T-Ag	T-Antigen
TRF2	Telomeric repeat binding factor 2
UBC	Ubiquitin C

Primersequenzen

Sequenzierung

Bezeichnung	**Sequenz 5' > 3'**	**Spezifität**
MCfor	ATCCTGAAAGATGTAGTGGC	*MCPH1*-cDNA
MC200rev	ATCTTTGAAGATAACGTGAGTTAC	
MC344rev	TCTTTGGGCTGCATACATTTACGTT	
MC394for	GAGAAAATGGCTAAAGAGCTACAAAGGC	
MC613rev	GGTGCTTCACACAGAGAGTTACTTGG	
MC716for	GTGGAAACTCAGGATGTGGAAATCAG	
MC1070rev	TCTCCTGAGACATACCTGCAG	
MC1171for	AAGGCAGGCTGCAGCACGTG	
MC1504for	GCCCCTGAAGAAGCCCTAAGGTG	
MC1804for	TTACCCGGAGGATACAGTGGAAGTG	
MC2200rev	TCGAACGGCTCCTCAGAAATC	
MC2316for	GGCCAAGCTCTGTGAACTAGTCCACCTG	
MCex5for	CGTAAATGTATGCAGC	*MCPH1*-gDNA (Exon 5)
MCex5rev	CTGTATTATATTTCTTAGCTTAC	
GFP300for	GACGACGGCAACTACAAGAC	*EGFP*-Sequenz
GFP650for	GTCCTGCTGGAGTTCGTGA	
GFP780rev	GCTTCGGCCAGTAACGTTA	
IRES1rev	GACTTATTCGATGCTAGTATACC	*IRES*-Kassette
IRES2for	CTTCTTGACGAGCATTCCTAG	
IRES3rev	CAGATCAGATCCCATACAATG	
IRES4for	GGATGCCCAGAAGGTACC	
KRAB1for	CGTCCATGGCTAGATTAGATAA	*tTR-KRAB*-Sequenz
KRAB2rev	CCTATCTAACATCTCAATGGC	
KRAB3for	CGTATTGGAAGATCAAGAGC	
KRAB4rev	CCACAAATACATCCTTGAAGG	
pCL1for	GTCCTCCGACAGACTGAG	*pCL1THPC*-Vektor
T3for	AATTAACCCTCACTAAAGGA	*pSC-B-amp/kan*-Vektor
T7rev	CGCGTAATACGACTCACTATA	

Klonierung

Bezeichnung	**Sequenz 5' > 3'**	**Spezifität**
EGFP_ATG	AAACGGTAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	*EGFP*-Kassette
EGFP_TAA	AAAGATCTAAACGCTTTACTTGTACAGCTCGTCC	
MCfor(*Bsr*G I)	TAATTGTACATGGCGGCCCCCAT	*MCPH1*-CDS
MCrev(*Bsr*G I)	TTTATGTACATCATTGTGACAATAGGTAGTTTTC	
MCrev(*Eco*R I)	CAAGAATTCGATTTACGCCTCGATCATTG	
MCEx8rev(*Bsr*G I)	TTTGTACATCACATTCCACTGTATCCTCC	*MCPH1Δe9-14* (CDS)
cMCd9-14(*Bsr*G I)	ATTTGTACATTAATATATGTTCAGAAAGCCA	*MCPH1Δe9-14* (3'UTR)
MCEx7for(*Bsr*G I)	GCTGTACATTCAGCAGTCTCATGATAATCC	*MCPH1Δe1-7*
V5_ATGfor	TTTTCCGGATGGGTAAGCCTATCCCT	*V5*-Epitop-Kassette
V5rev	TTTTTCCGGACCATGGTGATGGTG	
NeoRfor	TTTTGTACATAAGTCGACGGT	*NeoR*-Kassette
NeoRrev	TTTATCTATCCGGATCGATC	
puc2CL1KR3780f	GATCGTGTACAGAAATGTGATG	*IRES*-Kassette
IRESrev(*Bsr*G I)	GCCTGTACATTGGCTGCAGGAATTATC	
Pr1for(*Xho* I)	TTATCTCGAGGTATCAGAGTCCCCT	*MCPH1*-Promotoren
Pr1rev(*Hin*d III)	TAAAAGCTTAGACAGGCAGCGAG	
Pr2for(*Xho* I)	AAAACTCGAGGACAGAAACACAAAAAGG	
Pr2rev(*Hin*d III)	TTTAAGCTTCAACTCTTGAATATATTTCTA	
cPr1for(*Hin*d III)	TAAAAGCTTGTATCAGAGTCCCCT	
cPr1rev(*Xho* I)	TTATCTCGAGAGACAGGCAGCGAG	
cPr2for(*Hin*d III)	TTTAAGCTTGACAGAAACACAAAAAGG	
cPr2rev(*Xho* I)	AAACTCGAGCAACTCTTGAATATATTTCTA	

NLS-Mutagenese

Bezeichnung	**Sequenz 5' > 3'**	**Spezifität**
NLS1(*Pvu* I)for	CTAATTCGATCGTGTATGCAGCCCAAAGAT	NLS1
NLS1(*Pvu* I)rev	CATACACGATCGAATTAGGCTTGATAAGTGTTC	
NLS3(*Age* I)for	AGCGGAACCGGTGCCACAGTCAAGTATCTG	NLS3
NLS3(*Age* I)rev	TGTGGCACCGGTTCCGCTGTAGGGCC	

5’-RACE

Bezeichnung	**Sequenz 5’ > 3’**	**Spezifität**
5RACE_out	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG	5’RACE-Adapter
5RACE_in	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG	
5RACE_ex8out	CGAGGTGAGTGAAAGATGGTGATGA	*MCPH1* allgemein
5RACE_ex8in	GGAATTCGGATCCTTCCAACTTCCTTTCCTGA	
5RACE_int8out	AGCGAAGGTGACTTGGAAAAGGAGA	*MCPH1Δe9-14*
5RACE_int8in	GGAATTCACTTCCACTGTATCCTCCGGGTAAGT	
5RACE_ex9out	CAACCTGGATGACGACATTCTGCT	*MCPH1-FL*
5RACE_ex9in	GGAATTCGTCCTTAAAGCCGTCACATGAGTCA	
5RACE_ex10	CTTTTCAGATGGCATGCTTGTCATG	
5RACE_ex89	GGTCTATTTTTAACACTTCCACTGTATC	

3’-RACE

Bezeichnung	**Sequenz 5’ > 3’**	**Spezifität**
3RACE_out	GCGAGCACAGAATTAATACGACT	3’RACE-Adapter
3RACE_in	CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG	
3RACE_Int8out	GATGACTTGCTGTCTTGTGGAACT	*MCPH1Δe9-14* (3’UTR)
3RACE_Int8in	GGTTAAGTCTGTTAGGAATCTATTTCTCC	

qPCR

Bezeichnung	**Sequenz 5’ > 3’**	**Spezifität**
FL_f	TTATAGTTGACTGTAACATGGAGACG	*MCPH1*-FL
FL_r	ATGAGGTTTGATGAGGTCCTTAA	
d9-14_f	ACTTGCTGTCTTGTGGAACTTCTA	*MCPH1Δe9-14*
d9-14_r	ACTTCACTCCCCTCAGTTATTCATACT	
d8_f	GTGATACTTTGTGTTCAGGTGTT	*MCPH1Δe8*
d8_r	TTTGCCTCTCCCACTTTTCTT	

Klonierungsstrategien und Vektorkarten

Lentivirale Vektoren

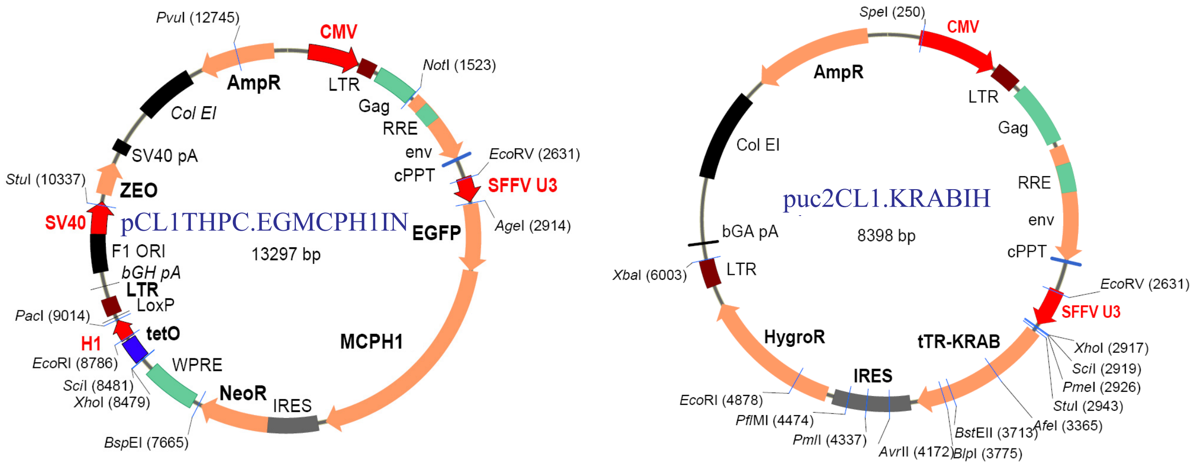


Abbildung 5.4 *Vektorkarten von pCL1THPC.EGMCPH1IN und pucCL1.KRABIH. Rote und orange-farbene Pfeile zeigen die Promotor- bzw. kodierende Sequenzen. Die übrigen Elemente sind durch Rechtecke wie beschriftet angegeben.*

Die Original-pCL1-Vektoren stammten aus dem Labor von Prof. H. Hanenberg (Düsseldorf). Der pCL1THPC:EGMCPH1IN-Vektor wurde ausgehend aus dem pCL1THPC-Vektor konstruiert (Abb. 5.5). Da anfangs MCPH1 mit einem V5-Epitop versehen werden sollte, wurde die EGFP-Kassette im pCL1THPC durch die kodierende *MCPH1*-Sequenz (*Full-length*-Sequenz) mittels der Schnittstellen *Age* I und *Bsr*G I ausgetauscht. Die *MCPH1*-Sequenz wurde zuvor mittels PCR aus cDNA (synthetisiert aus RNA-Extrakten aus HeLa) amplifiziert. *V5*-Sequenz wurde mittels PCR aus *TOPO Linear Element* (Invitrogen) amplifiziert, mit *Bsp*E I geschnitten und über die *Age* I -Schnittstelle in pCL1THPC:MCPH1 einkloniert. Die kodierende Sequenz des Neomycin-Restistenzgens wurde samt der *IRES*-Kassette aus dem S11:FJIN-Vektor mittels PCR amplifiziert und über die *Bsp*E I / *Bsr*G I in pCL1THPC:V5MCPH1 einkloniert. Da sich die immunologische Detektion der V5-MCPH1-Fusionsproteine über den V5-Epitop problematisch erwies, wurde dieser Epitop durch EGFP-Sequenz ersetzt. Dazu wurde pCL1THPC mit *Not* I und *Bsp*E I geschnitten und das *EGFP* enthaltendes Fragment anstelle des aus dem pCL1THPC:V5MCPH1 durch *Not* I / *Age* I herausgeschnittenen Fragments einkloniert. Dadurch wurde die *MCPH1*-Sequenz von *Bsr*G I-Schnittstellen flankiert. Diese wurden verwendet, um die *MCPH1-FL*-Sequenz durch die anderen *MCPH1*-Isoformsequenzen zu ersetzen.

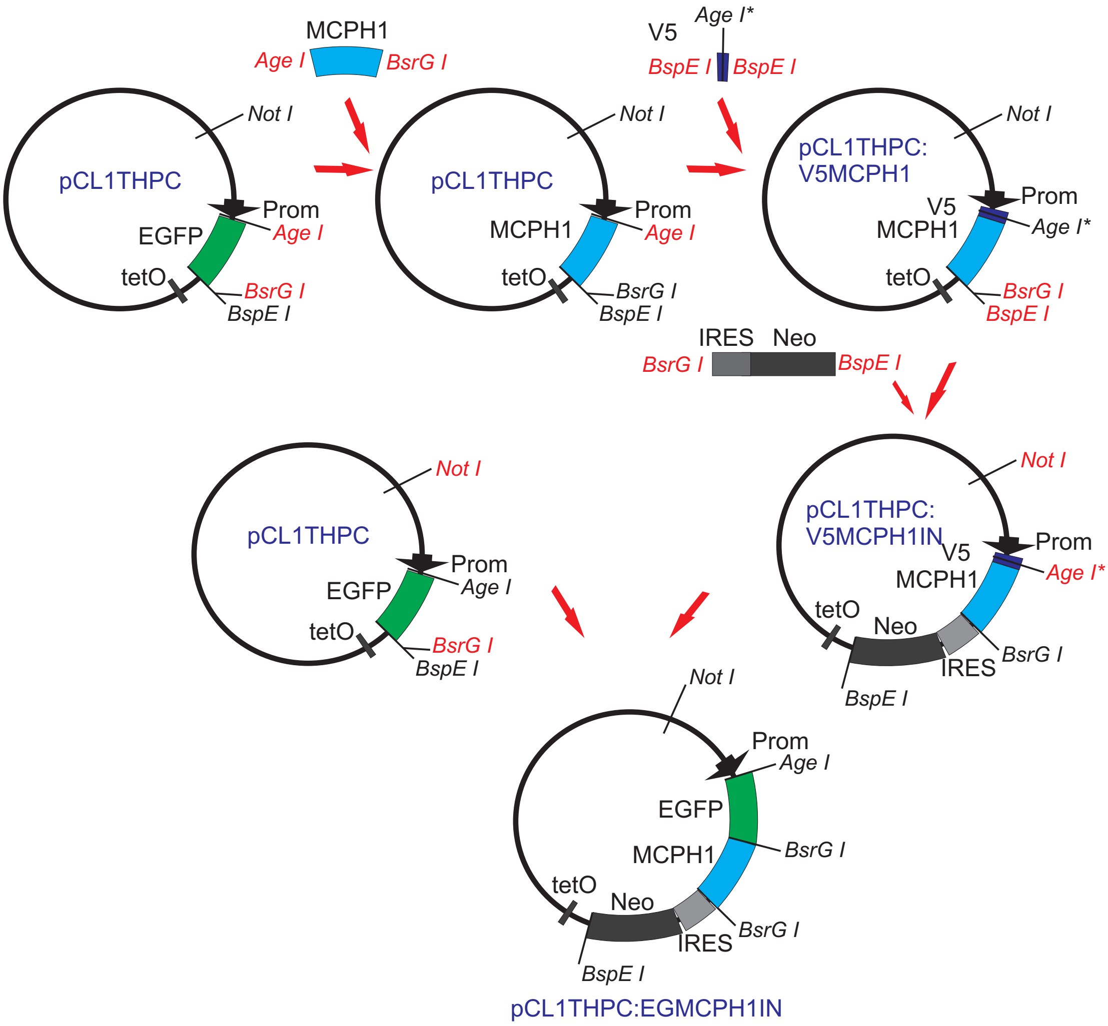


Abbildung 5.5 *Klonierungsstrategie vom pCL1THPC:EGMCPH1IN. Dargestellt sind Elemente, die umkloniert wurden sowie das tetO-Operon. Mit rot sind die Schnittstellen markiert, die bei dem jeweiligen Klonierungschritt verwendet wurden. Mit * ist die Age I-Schnittstelle von V5-Sequenz kennzeichnet, die nicht identisch mit der Age I-Schnittstelle im pCL1THPC ist. Für weitere Details vgl. Text.*

Der regulatorische Vektor puc2CL1:KRABIH wurde ausgehend aus den Vektoren pCL1H und puc2CL1:KRABIN konstruiert (Abb 5.6). Dazu wurde die *IRES*-Kassette und ein Teil der *tTR-KRAB*-Sequenz (bis *Bsr*G I-Schnittstelle, 3780) mittels PCR amplifiziert, mit *Bsr*G I geschnitten und in die *Acc*65 I-Schnittstelle des pCL1H-Vektors einkloniert. Dieses Zwischenkonstrukt sowie puc2CL1KRABIN wurden mit *Avr* II und *Xba* I geschnitten. Das Fragment mit der *Hygro-IRES*-Sequenz aus dem Zwischenplasmid wurde anstelle der *Neo-IRES*-Sequenz in puc2CL1:KRABIN einkloniert. Die Ausrichtung und die Korrektheit der einklonierten Sequenzen wurden durch Sequenzierung überprüft.

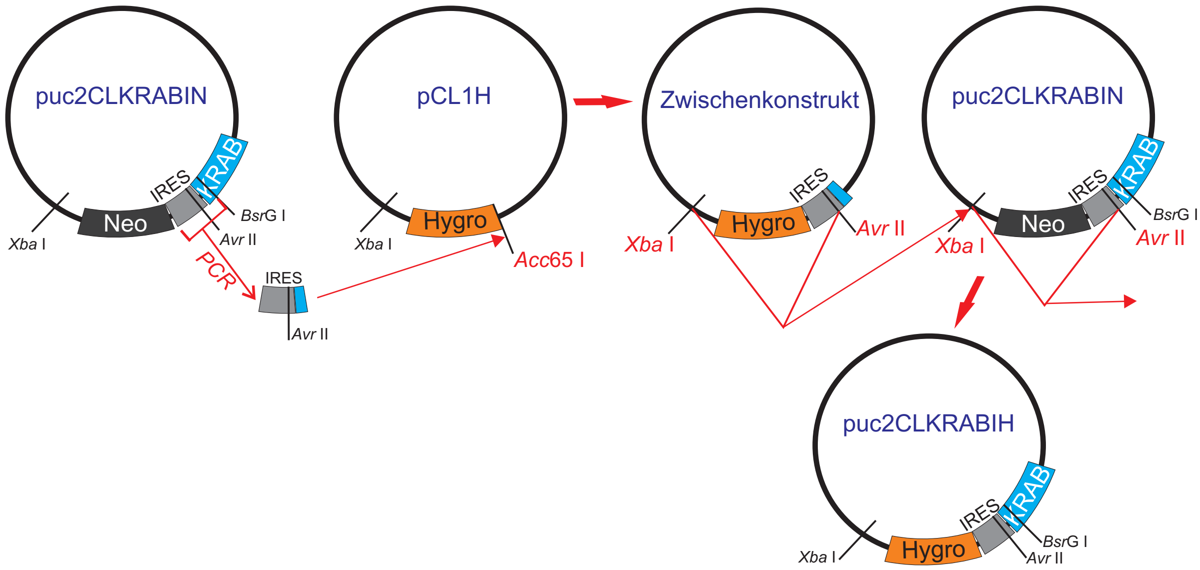


Abbildung 5.6 *Klonierungsstrategie vom puc2CL1KRABIH. Dargestellt sind Elemente, die umkloniert wurden. Die Vorgehensweise ist im Text erläutert.*

pGL3 (Promotor-Analyse)

Die mittels PCR amplifizierten Sequenzen mit der mutmaßlichen Promotor-Aktivitäten wurden über die Schnittstellen *Xho* I und *Hind* III in den pGL3-Basic-Vektor (Abb. 5.7) einkloniert. Der pGL3-SV40-Vektor mit einkloniertem SV40-Promotor diente als positive Kontrolle.

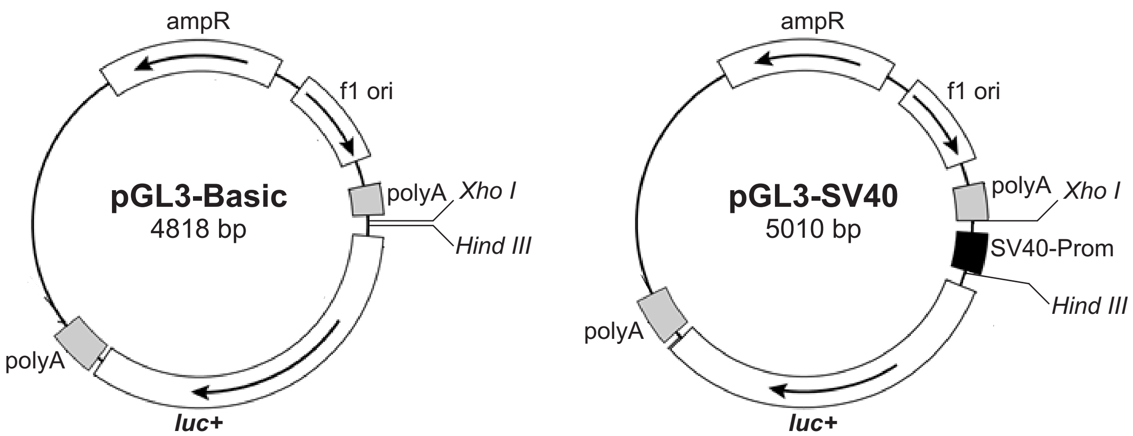


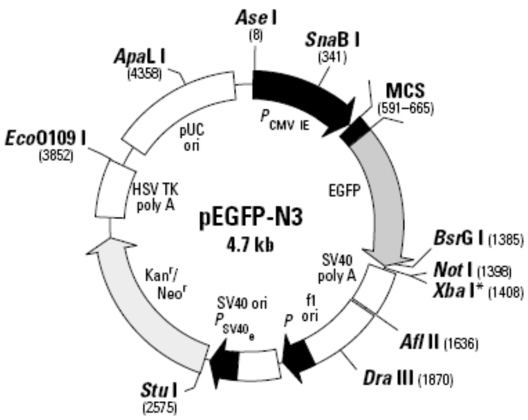
Abbildung 5.7 *Vektorkarten von pGL3-Basic und pGL3-SV40. luc+: Luciferase-cDNA; ampR: Ampicillin-Resistenz-cDNA; polyA: Polyadenylierungssignale. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung. Abbildung modifiziert nach Benutzerhandbuch "pGL3 Luciferase Reporter Vectors, technical manual" von Promega.*

pEGFP-N3 (NLS-Analyse)

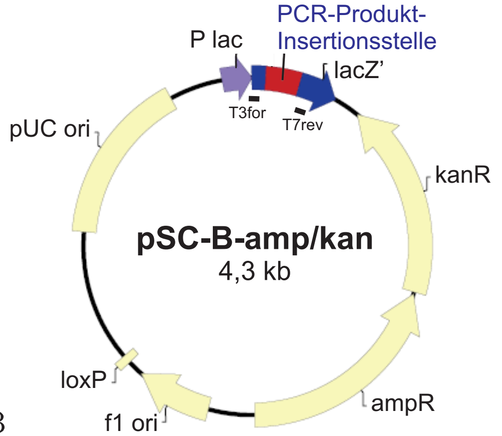
Für die NLS-Untersuchung wurden die MCPH1-NLS-Varianten in pEGFP-N3-Vektor (Abb. 5.8A) über die Schnittstelle *Bsr*GI *in frame* mit der *EGFP*-Sequenz einkloniert. Die Orientierung und die Korrektheit des jeweiligen Inserts wurden über Sequenzierung mit *EGFP*- bzw. *MCPH1*-spezifischen Primern überprüft.

pSC-B (RACE)

Die RACE-PCR-Produkte wurden in pSC-B-Vektor (Abb. 5.8B) über *blunt-end* einkloniert. Durch Insertion eines PCR-Produkts wird die kodierende Sequenz für β-galactosidase unterbrochen, so dass eine *blue-white screening* möglich war. Die T3for- und T7rev-Primer-Bindungsstellen aufwärts bzw. abwärts der Insertionsstelle erlaubten die Sequenzierung des Inserts.



A



B

Abbildung 5.8 *A. Vektorkarte von pEGFP-N3. P-CMV: CMV-Promotor; MCS: multiple cloning site; EGFP: EGFP-kodierende Sequenz; KanR/NeoR: kodierende Sequenz für die Kanamycin- bzw. Neomycin-Resistenz. Abbildung aus Benutzerhandbuch "pEGFP-N3 Vector Information" von Clontech. B. Vektorkarte von pSC-B-amp/kan. lacZ': β-galactosidase-CDS; P lac: Promotor; kanR/ampR: kodierende Sequenzen für Kanamycin- bzw. Ampicillin-Resistenz. T3for/T7rev: Primerbindungsstellen. Abbildung modifiziert nach Benutzerhandbuch "StrataClone Blunt PCR Cloning Kit, instruction manual" von Stratagene.*

Anhang II

Eigene Publikationen

Artikel

- Trimborn M, Richter R, Sternberg N, **Gavvovidis I**, Schindler D, Jackson AP, Prott EC, Sperling K, Gillessen-Kaesbach G, Neitzel H (2005) The first missense alteration in the MCPH1 gene causes autosomal recessive microcephaly with an extremely mild cellular and clinical phenotype. Human mutation 26(5): 496

- Bechtold A, Friedl R, Kalb R, Gottwald B, Neveling K, **Gavvovidis I**, Herterich S, Schindler D, Hoehn H (2006) Prenatal exclusion/confirmation of Fanconi anemia via flow cytometry: a pilot study. Fetal Diagn Ther 21(1): 118-124

- Schindler D, Friedl R, **Gavvovidis I**, Kalb R, Neveling K, Linka Y, Hanenberg H, Kubbies M, Hoehn H (2007) Applications of cell cycle testing in Fanconi anemia. Schindler D, Hoehn H (eds): Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging. Monogr Hum Genet. Basel, Karger, 2007, vol 15, pp 110-130

- Trimborn M, Ghani M, Walther DJ, Dopatka M, Dutrannoy V, Busche A, Meyer F, Nowak S, Nowak J, Zabel C, Klose J, Esquitino V, Garshasbi M, Kuss AW, Ropers HH, Mueller S, Poehlmann C, **Gavvovidis I**, Schindler D, Sperling K, Neitzel H (2010) Establishment of a mouse model with misregulated chromosome condensation due to defective Mcph1 function. PLoS One 5(2): e9242

- **Gavvovidis I**, Trimborn M, Kaiser FJ, Purps J, Hanenberg H, Neitzel H, Schindler D Complementation and expression studies of MCPH1/microcephalin and variants. Manuscript submitted.

- **Gavvovidis I**, Poehlmann C, Marchal JA, Schindler D, Neitzel H, Trimborn M Analysis of DNA damage response in MCPH1 patient cells. Manuscript in preparation.

Tagungsbeiträge

- **Gavvovidis I**, Trimborn M, Poehlmann C, Neitzel H, Schindler D: Analysis of the G2/M checkpoint control in cell lines of MCPH1 patients. 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2006, Heidelberg, Deutschland.
- **Gavvovidis I**, Trimborn M, Neitzel H, Schindler D: Alternative splicing variants of the human MCPH1 gene. 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2007, Bonn, Deutschland.
- **Gavvovidis I**, Trimborn M, Weissflog L, Hanenberg H, Neitzel H, Schindler D: N-terminus of MCPH1 regulates chromosome condensation. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2008, Hannover, Deutschland.
- **Gavvovidis I**, Trimborn M, Weissflog L, Hanenberg H, Neitzel H, Schindler D: Alternative splicing variants of MCPH1 with distinct functions. The European Human Genetics Conference, 2008, Barcelona, Spain.
- Trimborn M, **Gavvovidis I**, Poehlmann C, Stumm M, Wei R, Schindler D, Neitzel H: Investigation of the DNA damage response in lymphoblastoid cell lines of MCPH1 patients. Tenth Biennial Meeting of the German Society for Research on DNA Repair, 2008, Berlin, Deutschland.
- **Gavvovidis I**, Trimborn M, Kaiser FJ, Schoenefeldt C, Meier D, Neitzel H, Schindler D: Analysis of the promoter and nuclear localization signals in MCPH1. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2009, Aachen, Deutschland.
- Trimborn M, Purps J, Poehlmann C, **Gavvovidis I**, Richter R, Garshasbi M, Busche A, Neitzel H: Comparison of the effects of MCPH1 mutations and RNAi against MCPH1 on checkpoint control, centrosomes, and transcription. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2009, Aachen, Deutschland.
- **Gavvovidis I**, Trimborn M, Kaiser FJ, Meier D, Neitzel H, Schindler D: Analysis of promoter regions and nuclear localization signals in MCPH1. EMBO (European Molecular Biology Organization) Meeting, 2009, Amsterdam, Netherlands.
- Trimborn M, **Gavvovidis I**, Poehlmann C, Stumm M, Wei R, Schindler D, Neitzel H: DNA damage response in cell lines of MCPH1 patients. 1st Charité Cancer Day, 2009, Berlin, Deutschland.
- **Gavvovidis I**, Trimborn M, Kaiser FJ, Hanenberg H, Neitzel H, Schindler D: Identification and characterization of human MCPH1 splice variants and NLS motifs. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2010, Hamburg, Deutschland.
- Trimborn M, Ghani M, Walther DJ, Dopatka M, Dutrannoy V, Busche A, Meyer F, Nowak S, Nowak J, Zabel C, Klose J, Esquitino V, Garshasbi M, Kuss AW, Ropers HH, Mueller S, Poehlmann C, **Gavvovidis I**, Schindler D, Sperling K, Neitzel H: Establishment of a mouse model with misregulated chromosome condensation due to defective Mcph1 function. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2010, Hamburg, Deutschland.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Ioannis Gavvovidis

Geburtsdatum 07.01.1978

Geburtsort Tsalka, Georgien

Staatsangehörigkeit Griechisch

Schulausbildung

1984-1993 121. Schule der Mittelschulausbildung. Tiflis, Georgien

1993-1996 Lyzeum von Diavata. Thessaloniki, Griechenland

13.06.1996 Schulabschluss: Apolytirio (Abitur)

1999 Deutschkurs, Oberstufe. Goethe-Institut. Schwäbisch Hall, Deutschland

14.12.1999 Zentrale Oberstufenprüfung des Goethe-Instituts

Studium

2000-2002 Biologie-Studium, Grundstudium. J.-Gutenberg-Universität Mainz. Mainz, Deutschland

2002-2005 Biologie-Studium, Hauptstudium. J.-M.-Universität Würzburg. Würzburg, Deutschland

2005 Studienabschluss: Diplom-Biologe Univ.

seit 2007 Promotion. Institut für Humangenetik, J.-M.-Universität Würzburg. Würzburg, Deutschland

Berufliche Tätigkeiten

1999 Wehrdienst. Griechische Kriegsmarine. Attika, Griechenland

2003-2005 Studentische Hilfskraft. Institut für Humangenetik, J.-M.-Universität Würzburg. Würzburg, Deutschland

2005-2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter. Institut für Humangenetik, J.-M.-Universität Würzburg. Würzburg, Deutschland

Sonstiges

Teilnahme an Workshops

Real-Time PCR-User Meeting

Neuere Methoden der Zellanalytik (Durchflusszytometrie)

Teilnahme an wissenschaftlichen Tagungen

The European Human Genetics Conference

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik

The EMBO Meeting

Biennial Meeting of the German Society for Research on DNA Repair

Fremdsprachenkenntnisse

Englisch, französisch, griechisch, russisch, türkisch

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Detlev Schindler angefertigt. Dem Leiter der Arbeitsgruppe und meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Detlev Schindler gilt daher ein besonderer Dank für die interessante Themenstellung sowie die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten unter hervorragenden Bedingungen durchzuführen.

Mein Dank gilt dabei auch Herrn Prof. Dr. Holger Höhn für sein Interesse am Verlauf dieser Arbeit, für seine moralische Unterstützung und für seine aufheiternden Kommentare.

Ein großer Dank geht aber auch an meine Kollegen Richard Friedl, Benni Gottwald, Dr. Tilman Heinrich, Daniel Meier, Beatrice Schuster, Daniela Endt und alle die hier namentlich nicht erwähnt wurden. Denn sie haben mich nicht nur tatkräftig unterstützt, sondern mich auch stets aufgebaut und für die erforderliche Abwechslung gesorgt.

Herrn Dr. Marc Trimborn (Berlin) danke ich besonders für die intensive Zusammenarbeit und die zahlreichen Diskussionen mit Ideen und Anregungen, welche entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Auch danke ich Frau Prof. Dr. Heidemarie Neitzel (Berlin), Herrn Prof. Dr. Helmut Hanenberg (Düsseldorf) sowie Herrn Dr. Frank J. Kaiser (Lübeck) für die hervorragende Zusammenarbeit. Frau Dr. Sabine Hetterich (Würzburg) danke ich für die hilfreichen Kommentare und Bemerkungen.

Ich danke den Diplomandinnen bzw. Praktikantinnen Lena Weissflog, Desislava Boyanova und Claudia Schönefeldt, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik und des Lehrstuhls für Biochemie in Würzburg sowie des Instituts für Humangenetik in Berlin.

Herrn Prof. Dr. Erich Buchner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen meinen Freunden, von denen jeder auf seine eigene Art direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, möchte ich ganz herzlich danken.

Meiner Familie möchte ich danken, dass sie mich zu dem gemacht haben, was ich bin.
Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την εμπιστοσύνη και την αμέριστη υποστήριξη που μου παρείχε.

Und schließlich geht ein ganz besonderer Dank an Patrick Sheedy, der mich stets bestärkt und motiviert hat.

Literaturverzeichnis

[1] Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell 33(2): 389-396

[2] Michal G (Hrsg.) (1999) Biochemical pathways - Biochemie-Atlas. Heidelberg; Berlin: Spectrum, Akad. Verl.: 154-156

[3] Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 81(3): 323-330

[4] Dimova DK, Dyson NJ (2005) The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. Oncogene 24(17): 2810-2826

[5] Pines J, Rieder CL (2001) Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. Nat Cell Biol 3(1): E3-6

[6] Ishida R, Takashima R, Koujin T, Shibata M, Nozaki N, Seto M, Mori H, Haraguchi T, Hiraoka Y (2001) Mitotic specific phosphorylation of serine-1212 in human DNA topoisomerase IIalpha. Cell Struct Funct 26(4): 215-226

[7] Kimura K, Rybenkov VV, Crisona NJ, Hirano T, Cozzarelli NR (1999) 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation. Cell 98(2): 239-248

[8] Kimura K, Hirano M, Kobayashi R, Hirano T (1998) Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. Science 282(5388): 487-490

[9] McIntosh JR, Koonce MP (1989) Mitosis. Science 246(4930): 622-628

[10] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem 73: 39-85

[11] Li L, Zou L (2005) Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. J Cell Biochem 94(2): 298-306

[12] Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. Oncogene 22(53): 8543-8567

[13] Hartwell LH, Kastan MB (1994) Cell cycle control and cancer. Science 266(5192): 1821-1828

[14] Krauss MJ, Morrissey AE, Winn HN, Amon E, Leet TL (2003) Microcephaly: an epidemiologic analysis. Am J Obstet Gynecol 188(6): 1484-1489; discussion 1489-1490

[15] Woods CG (2004) Human microcephaly. Curr Opin Neurobiol 14(1): 112-117

[16] Mochida GH, Walsh CA (2001) Molecular genetics of human microcephaly. Curr Opin Neurol 14(2): 151-156

[17] Peiffer A, Singh N, Leppert M, Dobyns WB, Carey JC (1999) Microcephaly with simplified gyral pattern in six related children. Am J Med Genet 84(2): 137-144

[18] Jackson AP, McHale DP, Campbell DA, Jafri H, Rashid Y, Mannan J, Karbani G, Corry P, Levene MI, Mueller RF, Markham AF, Lench NJ, Woods CG (1998) Primary autosomal recessive microcephaly (MCPH1) maps to chromosome 8p22-pter. Am J Hum Genet 63(2): 541-546

[19] Cox J, Jackson AP, Bond J, Woods CG (2006) What primary microcephaly can tell us about brain growth. Trends Mol Med 12(8): 358-366

[20] Miles M, Beer D (1996) Pakistan's microcephalic chuas of Shah Daulah: cursed, clamped or cherished. Hist Psychiatry 7(28 pt 4): 571-589

[21] Trimborn M, Bell SM, Felix C, Rashid Y, Jafri H, Griffiths PD, Neumann LM, Krebs A, Reis A, Sperling K, Neitzel H, Jackson AP (2004) Mutations in microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation. Am J Hum Genet 75(2): 261-266

[22] Roberts E, Jackson AP, Carradice AC, Deeble VJ, Mannan J, Rashid Y, Jafri H, McHale DP, Markham AF, Lench NJ, Woods CG (1999) The second locus for autosomal recessive primary microcephaly (MCPH2) maps to chromosome 19q13.1-13.2. Eur J Hum Genet 7(7): 815-820

[23] Moynihan L, Jackson AP, Roberts E, Karbani G, Lewis I, Corry P, Turner G, Mueller RF, Lench NJ, Woods CG (2000) A third novel locus for primary autosomal recessive microcephaly maps to chromosome 9q34. Am J Hum Genet 66(2): 724-727

[24] Jamieson CR, Govaerts C, Abramowicz MJ (1999) Primary autosomal recessive microcephaly: homozygosity mapping of MCPH4 to chromosome 15. Am J Hum Genet 65(5): 1465-1469

[25] Jamieson CR, Fryns JP, Jacobs J, Matthijs G, Abramowicz MJ (2000) Primary autosomal recessive microcephaly: MCPH5 maps to 1q25-q32. Am J Hum Genet 67(6): 1575-1577

[26] Leal GF, Roberts E, Silva EO, Costa SM, Hampshire DJ, Woods CG (2003) A novel locus for autosomal recessive primary microcephaly (MCPH6) maps to 13q12.2. J Med Genet 40(7): 540-542

[27] Kumar A, Girimaji SC, Duvvari MR, Blanton SH (2009) Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. Am J Hum Genet 84(2): 286-290

[28] Jackson AP, Eastwood H, Bell SM, Adu J, Toomes C, Carr IM, Roberts E, Hampshire DJ, Crow YJ, Mighell AJ, Karbani G, Jafri H, Rashid Y, Mueller RF, Markham AF, Woods CG (2002) Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. Am J Hum Genet 71(1): 136-142

[29] Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Scott S, Higgins J, Hampshire DJ, Morrison EE, Leal GF, Silva EO, Costa SM, Baralle D, Raponi M, Karbani G, Rashid Y, Jafri H, Bennett C, Corry P, Walsh CA, Woods CG (2005) A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. Nat Genet 37(4): 353-355

[30] Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, Springell K, Mahadevan M, Crow YJ, Markham AF, Walsh CA, Woods CG (2002) ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. Nat Genet 32(2): 316-320

[31] Bond J, Scott S, Hampshire DJ, Springell K, Corry P, Abramowicz MJ, Mochida GH, Hennekam RC, Maher ER, Fryns JP, Alswaid A, Jafri H, Rashid Y, Mubaidin A, Walsh CA, Roberts E, Woods CG (2003) Protein-truncating mutations in ASPM cause variable reduction in brain size. Am J Hum Genet 73(5): 1170-1177

[32] Neitzel H, Neumann LM, Schindler D, Wirges A, Tonnies H, Trimborn M, Krebsova A, Richter R, Sperling K (2002) Premature chromosome condensation in humans associated with microcephaly and mental retardation: a novel autosomal recessive condition. Am J Hum Genet 70(4): 1015-1022

[33] Lin SY, Elledge SJ (2003) Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. Cell 113(7): 881-889

[34] Huyton T, Bates PA, Zhang X, Sternberg MJ, Freemont PS (2000) The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. Mutat Res 460(3-4): 319-332

[35] Trimborn M, Schindler D, Neitzel H, Hirano T (2006) Misregulated chromosome condensation in MCPH1 primary microcephaly is mediated by condensin II. Cell cycle 5(3): 322-326

[36] Hirano T (2005) Condensins: organizing and segregating the genome. Curr Biol 15(7): R265-275

[37] Alderton GK, Galbiati L, Griffith E, Surinya KH, Neitzel H, Jackson AP, Jeggo PA, O'Driscoll M (2006) Regulation of mitotic entry by microcephalin and its overlap with ATR signalling. Nat Cell Biol 8(7): 725-733

[38] Lin SY, Rai R, Li K, Xu ZX, Elledge SJ (2005) BRIT1/MCPH1 is a DNA damage responsive protein that regulates the Brca1-Chk1 pathway, implicating checkpoint dysfunction in microcephaly. P Natl Acad Sci USA 102(42): 15105-15109

[39] Rai R, Dai H, Multani AS, Li K, Chin K, Gray J, Lahad JP, Liang J, Mills GB, Meric-Bernstam F, Lin SY (2006) BRIT1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity, and cancer. Cancer cell 10(2): 145-157

[40] Garshasbi M, Motazacker MM, Kahrizi K, Behjati F, Abedini SS, Nieh SE, Firouzabadi SG, Becker C, Ruschendorf F, Nurnberg P, Tzschach A, Vazifehmand R, Erdogan F, Ullmann R, Lenzner S, Kuss AW, Ropers HH, Najmabadi H (2006) SNP array-based homozygosity mapping reveals MCPH1 deletion in family with autosomal recessive mental retardation and mild microcephaly. Hum Genet 118(6): 708-715

[41] Trimborn M, Richter R, Sternberg N, Gavvovidis I, Schindler D, Jackson AP, Prott EC, Sperling K, Gillessen-Kaesbach G, Neitzel H (2005) The first missense alteration in the MCPH1 gene causes autosomal recessive microcephaly with an extremely mild cellular and clinical phenotype. Hum Mutat 26(5): 496

[42] Yang SZ, Lin FT, Lin WC (2008) MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis. EMBO Rep 9(9): 907-915

[43] Wood JL, Liang Y, Li K, Chen J (2008) Microcephalin/MCPH1 associates with the Condensin II complex to function in homologous recombination repair. Journal of Biological Chemistry 283(43): 29586-29592

[44] Kim H, Lee OH, Xin H, Chen LY, Qin J, Chae HK, Lin SY, Safari A, Liu D, Songyang Z (2009) TRF2 functions as a protein hub and regulates telomere maintenance by recognizing specific peptide motifs. Nat Struct Mol Biol 16(4): 372-379

[45] Rai R, Phadnis A, Haralkar S, Badwe RA, Dai H, Li K, Lin SY (2008) Differential regulation of centrosome integrity by DNA damage response proteins. Cell cycle 7(14): 2225-2233

[46] Tibelius A, Marhold J, Zentgraf H, Heilig CE, Neitzel H, Ducommun B, Rauch A, Ho AD, Bartek J, Kramer A (2009) Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1. J Cell Biol 185(7): 1149-1157

[47] Brunk K, Vernay B, Griffith E, Reynolds NL, Strutt D, Ingham PW, Jackson AP (2007) Microcephalin coordinates mitosis in the syncytial Drosophila embryo. Journal of cell science 120(Pt 20): 3578-3588

[48] Shatkin AJ, Manley JL (2000) The ends of the affair: capping and polyadenylation. Nat Struct Biol 7(10): 838-842

[49] Beelman CA, Parker R (1995) Degradation of mRNA in eukaryotes. Cell 81(2): 179-183

[50] Zhang MQ (1998) Statistical features of human exons and their flanking regions. Hum Mol Genet 7(5): 919-932

[51] Moore MJ, Sharp PA (1993) Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. Nature 365(6444): 364-368

[52] Will CL, Luhrmann R (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. Curr Opin Cell Biol 13(3): 290-301

[53] Freund M, Asang C, Kammler S, Konermann C, Krummheuer J, Hipp M, Meyer I, Gierling W, Theiss S, Preuss T, Schindler D, Kjems J, Schaal H (2003) A novel approach to describe a U1 snRNA binding site. Nucleic Acids Res 31(23): 6963-6975

[54] Lin S, Fu XD (2007) SR proteins and related factors in alternative splicing. Adv Exp Med Biol 623: 107-122

[55] Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, Fisette JF, Revil T, Chabot B (2007) hnRNP proteins and splicing control. Adv Exp Med Biol 623: 123-147

[56] Edmonds M (2002) A history of poly A sequences: from formation to factors to function. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 71: 285-389

[57] Colgan DF, Manley JL (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. Genes Dev 11(21): 2755-2766

[58] Beaudoing E, Freier S, Wyatt JR, Claverie JM, Gautheret D (2000) Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. Genome Res 10(7): 1001-1010

[59] Kornblihtt AR (2006) Chromatin, transcript elongation and alternative splicing. Nat Struct Mol Biol 13(1): 5-7

[60] Buratti E, Baralle FE (2004) Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. Mol Cell Biol 24(24): 10505-10514

[61] Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. Annu Rev Biochem 72: 291-336

[62] Nilsen TW, Graveley BR Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. Nature 463(7280): 457-463

[63] Schmucker D, Clemens JC, Shu H, Worby CA, Xiao J, Muda M, Dixon JE, Zipursky SL (2000) Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. Cell 101(6): 671-684

[64] Li Q, Lee JA, Black DL (2007) Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. Nat Rev Neurosci 8(11): 819-831

[65] Hughes TA (2006) Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. Trends Genet 22(3): 119-122

[66] Lejeune F, Maquat LE (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. Curr Opin Cell Biol 17(3): 309-315

[67] Matlin AJ, Clark F, Smith CW (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. Nat Rev Mol Cell Biol 6(5): 386-398

[68] Wang Z, Rolish ME, Yeo G, Tung V, Mawson M, Burge CB (2004) Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. Cell 119(6): 831-845

[69] House AE, Lynch KW (2008) Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. J Biol Chem 283(3): 1217-1221

[70] Caceres JF, Kornblihtt AR (2002) Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. Trends Genet 18(4): 186-193

[71] Kadener S, Cramer P, Nogues G, Cazalla D, de la Mata M, Fededa JP, Werbajh SE, Srebrow A, Kornblihtt AR (2001) Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. EMBO J 20(20): 5759-5768

[72] Tian B, Hu J, Zhang H, Lutz CS (2005) A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. Nucleic Acids Res 33(1): 201-212

[73] Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ (2002) Integrating mRNA processing with transcription. Cell 108(4): 501-512

[74] Bruce SR, Dingle RW, Peterson ML (2003) B-cell and plasma-cell splicing differences: a potential role in regulated immunoglobulin RNA processing. RNA 9(10): 1264-1273

[75] Thomas DB, Lingwood CA (1975) A model of cell cycle control: effects of thymidine on synchronous cell cultures. Cell 5(1): 37-42

[76] Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. P Natl Acad Sci USA 83(11): 3746-3750

[77] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 77(1): 51-59

[78] Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2009) GenBank. Nucleic Acids Res 37(Database issue): D26-31

[79] Stamm S, Riethoven JJ, Le Texier V, Gopalakrishnan C, Kumanduri V, Tang Y, Barbosa-Morais NL, Thanaraj TA (2006) ASD: a bioinformatics resource on alternative splicing. Nucleic Acids Res 34(Database issue): D46-55

[80] Maruyama K, Sugano S (1994) Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. Gene 138(1-2): 171-174

[81] Tabaska JE, Zhang MQ (1999) Detection of polyadenylation signals in human DNA sequences. Gene 231(1-2): 77-86

[82] Hu J, Lutz CS, Wilusz J, Tian B (2005) Bioinformatic identification of candidate cis-regulatory elements involved in human mRNA polyadenylation. RNA 11(10): 1485-1493

[83] Lee JY, Yeh I, Park JY, Tian B (2007) PolyA_DB 2: mRNA polyadenylation sites in vertebrate genes. Nucleic Acids Res 35(Database issue): D165-168

[84] Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D (1997) Improved splice site detection in Genie. J Comput Biol 4(3): 311-323

[85] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3(7): RESEARCH0034

[86] Wiznerowicz M, Trono D (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. J Virol 77(16): 8957-8961

[87] Nakai K, Horton P (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. Trends Biochem Sci 24(1): 34-36

[88] Hicks GR, Raikhel NV (1995) Protein import into the nucleus: an integrated view. Annu Rev Cell Dev Biol 11: 155-188

[89] Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. Cell 64(3): 615-623

[90] Jeffers LJ, Coull BJ, Stack SJ, Morrison CG (2008) Distinct BRCT domains in Mcph1/Brit1 mediate ionizing radiation-induced focus formation and centrosomal localization. Oncogene 27(1): 139-144

[91] Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, Yeh ET, Strauss JF, 3rd, Maul GG (1999) PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. J Cell Biol 147(2): 221-234

[92] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem 273(10): 5858-5868

[93] Xu X, Lee J, Stern DF (2004) Microcephalin is a DNA damage response protein involved in regulation of CHK1 and BRCA1. J Biol Chem 279(33): 34091-34094

[94] Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. Chromosoma 106(6): 348-360

[95] Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nat Biotechnol 21(6): 635-637

[96] Trimborn M, Ghani M, Walther DJ, Dopatka M, Dutrannoy V, Busche A, Meyer F, Nowak S, Nowak J, Zabel C, Klose J, Esquitino V, Garshasbi M, Kuss AW, Ropers HH, Mueller S, Poehlmann C, Gavvovidis I, Schindler D, Sperling K, Neitzel H (2010) Establishment of a mouse model with misregulated chromosome condensation due to defective Mcph1 function. PLoS One 5(2): e9242

[97] Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. Nat Genet 40(12): 1413-1415

[98] Rickmyre JL, Dasgupta S, Ooi DL, Keel J, Lee E, Kirschner MW, Waddell S, Lee LA (2007) The Drosophila homolog of MCPH1, a human microcephaly gene, is required for genomic stability in the early embryo. J Cell Sci 120(Pt 20): 3565-3577

[99] Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116(2): 281-297

[100] Rusinov V, Baev V, Minkov IN, Tabler M (2005) MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence. Nucleic Acids Res 33(Web Server issue): W696-700

[101] Mayoral RJ, Pipkin ME, Pachkov M, van Nimwegen E, Rao A, Monticelli S (2009) MicroRNA-221-222 regulate the cell cycle in mast cells. J Immunol 182(1): 433-445

[102] Richards MW, Leung JW, Roe SM, Chen J, Bayliss R (2009) A Pocket on the Surface of the N-Terminal BRCT Domain of Mcph1 Is Required to Prevent Abnormal Chromosome Condensation. J Mol Biol 395(5): 908-915

[103] Wood JL, Singh N, Mer G, Chen J (2007) MCPH1 functions in an H2AX-dependent but MDC1-independent pathway in response to DNA damage. J Biol Chem 282(48): 35416-35423

[104] Sudbeck P, Scherer G (1997) Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. J Biol Chem 272(44): 27848-27852

[105] Vandromme M, Cavadore JC, Bonnieu A, Froeschle A, Lamb N, Fernandez A (1995) Two nuclear localization signals present in the basic-helix 1 domains of MyoD promote its active nuclear translocation and can function independently. P Natl Acad Sci USA 92(10): 4646-4650

[106] Dworetzky SI, Lanford RE, Feldherr CM (1988) The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake. J Cell Biol 107(4): 1279-1287

[107] Dingwall C, Laskey RA (1991) Nuclear targeting sequences – a consensus? Trends Biochem Sci 16(12): 478-481

[108] Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. Cancer Res 64(7): 2390-2396

[109] Manke IA, Lowery DM, Nguyen A, Yaffe MB (2003) BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. Science 302(5645): 636-639

[110] Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. Cell 123(7): 1213-1226

[111] Liang Y, Gao H, Lin SY, Peng G, Huang X, Zhang P, Goss JA, Brunicardi FC, Multani AS, Chang S, Li K (2010) BRIT1/MCPH1 is essential for mitotic and meiotic recombination DNA repair and maintaining genomic stability in mice. PLoS Genet 6(1): e1000826

[112] Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. Cell 93(3): 467-476

[113] Maser RS, Zinkel R, Petrini JH (2001) An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. Nat Genet 27(4): 417-421

[114] Zhu J, Petersen S, Tessarollo L, Nussenzweig A (2001) Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. Curr Biol 11(2): 105-109

[115] Beier H, Grimm M (2001) Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. Nucleic Acids Res 29(23): 4767-4782

[116] Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Sarosi I, Sinclair AM, Spahr C, Um M, Van G, Begley CG (2006) Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. Blood 107(5): 1892-1895

[117] Woods CG, Bond J, Enard W (2005) Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings. Am J Hum Genet 76(5): 717-728

[118] Brand S, Rakic P (1979) Genesis of the primate neostriatum: [3H]thymidine autoradiographic analysis of the time of neuron origin in the rhesus monkey. Neuroscience 4(6): 767-778

[119] Haydar TF, Ang E, Jr., Rakic P (2003) Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon. P Natl Acad Sci USA 100(5): 2890-2895

[120] Rakic P (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. Trends Neurosci 18(9): 383-388

[121] Rusan NM, Peifer M (2007) A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. J Cell Biol 177(1): 13-20

[122] Wakefield JG, Bonaccorsi S, Gatti M (2001) The drosophila protein asp is involved in microtubule organization during spindle formation and cytokinesis. J Cell Biol 153(4): 637-648

[123] Yamashita YM, Jones DL, Fuller MT (2003) Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. Science 301(5639): 1547-1550

[124] Peng G, Yim EK, Dai H, Jackson AP, Burgt I, Pan MR, Hu R, Li K, Lin SY (2009) BRIT1/MCPH1 links chromatin remodelling to DNA damage response. Nat Cell Biol 11(7): 865-872

[125] Martens JA, Winston F (2003) Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. Curr Opin Genet Dev 13(2): 136-142

[126] Batsche E, Yaniv M, Muchardt C (2006) The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. Nat Struct Mol Biol 13(1): 22-29

[127] Nogues G, Kadener S, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR (2002) Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. J Biol Chem 277(45): 43110-43114

[128] Pan Q, Shai O, Misquitta C, Zhang W, Saltzman AL, Mohammad N, Babak T, Siu H, Hughes TR, Morris QD, Frey BJ, Blencowe BJ (2004) Revealing global regulatory features of mammalian alternative splicing using a quantitative microarray platform. Mol Cell 16(6): 929-941

[129] Conboy JG (1993) Structure, function, and molecular genetics of erythroid membrane skeletal protein 4.1 in normal and abnormal red blood cells. Semin Hematol 30(1): 58-73

[130] Krauss SW, Chasis JA, Rogers C, Mohandas N, Krockmalnic G, Penman S (1997) Structural protein 4.1 is located in mammalian centrosomes. P Natl Acad Sci USA 94(14): 7297-7302

[131] Hung LY, Tang CJ, Tang TK (2000) Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the gamma-tubulin complex. Mol Cell Biol 20(20): 7813-7825

[132] Ponting C, Jackson AP (2005) Evolution of primary microcephaly genes and the enlargement of primate brains. Curr Opin Genet Dev 15(3): 241-248